

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DIE PARAMUNISIERENDEN EIGENSCHAFTEN
VON BAKTERIENLYSATEN IN BAKTERIELLEN
INFEKTIONSMODELLEN BEI DER MAUS**

Jürgen Adler

*Less
München
1985*

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PARAMUNISIERENDEN EIGENSCHAFTEN VON BAKTERIENLYSATEN IN BAKTERIELLEN INFEKTIONSMODELLEN BEI DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Jürgen Adler
aus
Erlangen

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. M.-A. Hasslinger

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINLEITUNG	1
B SCHRIFTTUM	2
1. <u>Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit grampositiven Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten</u>	2
1.1. <u>Mykobakterien</u>	2
1.1.1. Lebende oder inaktivierte Ganzbakte- rien	2
1.1.2. Bakterienextrakte	3
1.1.3. Zellwandfraktionen	4
1.1.3.1. "Cell Wall Skeleton"	4
1.1.3.2. "Cord-Faktor"	4
1.1.3.3. "Water Soluble Adjuvant"	4
1.1.3.4. Muramyl-Dipeptid	5
1.2. <u>Bacterionema matruchotii</u>	8
1.3. <u>Listeria monocytogenes</u>	8
1.4. <u>Micropolyspora faeni</u>	9
1.5. <u>Laktobazillen</u>	9
1.6. <u>Streptokokken</u>	10
1.6.1. Symbioflor I ^R	10
1.6.2. "OK-432"	11
1.7. <u>Staphylokokken-Protein A</u>	12

	Seite
1.8. <u>Bacillus subtilis</u>	13
1.9. <u>Propionibakterien</u>	13
2. <u>Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit gramnegativen Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten</u>	17
2.1. <u>Bordetella pertussis</u>	17
2.2. <u>Brucella abortus</u>	18
2.3. <u>Klebsiella pneumoniae</u>	18
2.4. <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	20
2.5. <u>Mykoplasmen</u>	21
2.6. <u>Lipopolysaccharide</u>	21
2.7. <u>Dodekoral</u>	23
2.8. <u>Symbioflor II^R</u>	24
2.9. <u>Symbioflor Antigen A^R</u>	24
3. <u>Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit Kombinationspräparaten gramnegati- ver und grampositiver Bakterien</u>	25
3.1. <u>Broncho-Vaxom^R</u>	25
3.2. <u>IRS-19^R</u>	26
3.3. <u>Diribiotine</u>	26
4. <u>Zusammenstellung der bakteriellen Sub- stanzen mit paramunisierender Wirkung</u>	28

	Seite
C EIGENE UNTERSUCHUNGEN	30
1. <u>Material und Methoden</u>	30
1.1. <u>Versuchstiere</u>	30
1.2. <u>Herstellung bakterieller Paramunitäts-inducer</u>	30
1.2.1. Bakterienstämme	30
1.2.2. Keimvermehrung	30
1.2.3. Hydrolyse	31
1.2.4. Thermoinaktivierung	32
1.2.5. Bestrahlung	32
1.2.6. Formalinbehandlung	32
1.2.7. Phenol-Wasser-Extraktion	32
1.2.8. Mechanische Lyse	32
1.3. <u>Herstellung viraler Paramunitätsinducer</u>	33
1.3.1. PIND AVI	33
1.3.2. PIND ORF	33
1.4. <u>Applikationsmodus</u>	34
1.5. <u>Wirksamkeitsnachweis</u>	34
1.5.1. Belastungsmaterial	34
1.5.2. Infektionsbelastungsversuch	35
2. <u>Ergebnisse</u>	36

	Seite
D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	48
E ZUSAMMENFASSUNG	53
SUMMARY	54
F LITERATURVERZEICHNIS	55

A EINLEITUNG

Die Paramunisierung hat in den letzten Jahren verstärkt Eingang in die tierärztliche Praxis gefunden, und zwar vor allem zur Bekämpfung viraler Infektionen. Die zunehmende Verbreitung chemotherapieresistenter Bakterien macht es aber notwendig, die Wirkung speziell auch im Hinblick auf die Abwehr bakterieller Infektionen zu untersuchen.

Die bisherigen Erfahrungen über die Wirkung von Paramunitätsinducern gegen bakterielle Infektionen beschränken sich auf einige wenige Erreger. Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Infektionsmodellen fehlen bisher. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Wirksamkeit verschiedener Paramunitätsinducer an bakteriellen Infektionsmodellen bei der Maus überprüft. Neben bekannten Inducern viraler Herkunft (PIND AVI und PIND ORF) werden auch neue Inducer auf bakterieller Basis in die Versuche miteinbezogen. Die Wirksamkeitsprüfung beschränkt sich aber von vorneherein auf biologische Inducer, da sie im Gegensatz zu den chemischen Inducern bezüglich Rückstände, Resorbierbarkeit und Toxizität problemloser und in ihrem Funktionsmechanismus omnipotenter sind.

B SCHRIFTTUM

1. Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit grampositiven Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten

1.1. Mykobakterien

1.1.1. Lebende oder inaktivierte Ganzbakterien

Zur Immunisierung gegen Tuberkulose entwickelten CALMETTE und GUERIN den attenuierten Mykobakterium-bovis-Stamm BCG (Bacillus Calmette Guerin). Schon 1924 erkannten LEWIS und LOOVIS, daß dieser Stamm auch in der Lage ist, das Abwehrsystem eines Organismus unspezifisch zu steigern. In der Zwischenzeit liegen eine Vielzahl von Untersuchungen über die paramunisierende Wirkung von BCG vor.

Der Wirkungsmechanismus von BCG basiert auf einer initialen spezifischen Stimulierung des T-Zellsystems, gefolgt von einer vermehrten Ausschüttung löslicher Mediatoren, und zwar dem "Macrophage Chemotactic Factor" (MCF), "Macrophage Aggregating Factor" (MAF), "Migration Inhibitory Factor" (MIF), "Macrophage Mitogenic Factor" (MMF) und "Colony Stimulating Factor" (CSF) (HADDEN et al., 1977). Diese Mediatoren fördern die unspezifische Makrophagenproliferation und -aktivierung, die anhand verstärkter lysosomaler Enzymtätigkeit und gesteigerter Phagozytose von Listerien gemessen werden kann (YARKONI et al., 1977). Die stimulierten Makrophagen wiederum reagieren mit der Freisetzung des "Lymphocyte Activating Factor" (LAF) und von CSF, das einen Autofeedbackmechanismus gegenüber den monozytären Zellen in Gang setzt (HADDEN et al., 1977). Die aktivierten T-Lymphozyten produzieren ihrerseits vermehrt Faktoren, die die Makrophagenaktivität weiter unterhalten, aber auch das B-Zellsystem zur polyklonalen Antikörperproduktion

anregen (BANCK und FORSGREN, 1978; RÄSÄNEN et al., 1980).

Ein erregerunspezifischer Schutz durch vorherige BCG-Applikation kann bei parasitären (CLARK et al., 1976), bakteriellen (SENTERFITT und SHANDS, 1970) sowie viralen (STARR et al., 1976; SPENCER et al., 1977; LODMELL und EWALT, 1978) Infektionen nachgewiesen werden.

Die tumorhemmende Wirkung von BCG beruht auf einer gesteigerten NK-Zellaktivität (KREEFTENBERG et al., 1981) und vor allem auf der unspezifischen Zytotoxizität der Makrophagen (FREEDMAN et al., 1980; HIBBS et al., 1980). Tierexperimentell läßt sich durch BCG eine Entwicklungshemmung von spontanen, induzierten und transplantierten Tumoren beobachten (BAST et al., 1976; BALDWIN und PIMM, 1978; MATHEWS, 1981). In klinischen Studien wird BCG mit Erfolg bei verschiedenen menschlichen Malignomen eingesetzt. Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es aber zu einer Steigerung des Tumorstwachstums, so daß eine breite Anwendung in der Praxis vorerst noch unmöglich ist (JUNGI, 1976). Als Ursache dafür wird die Freisetzung blockierender Substanzen oder die Stimulation von T-Suppressorzellen (KLIMPEL und HENNY, 1978) und Makrophagen-Suppressorzellen (TURCOTTE, 1981) diskutiert.

1.1.2. Bakterienextrakte

"Methanol Extraction Residue" (MER) erhält man nach Methanol-Extraktion von phenolinaktivierten und mit Aceton gewaschenen Mykobakterien.

Die unspezifische Schutzwirkung ist im Tierexperiment gegen ein breites Spektrum mikrobieller Erreger und in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen worden (WEISS, 1976). Die therapeutische Anwendung von MER in der Praxis wird aber durch die toxischen Nebenwirkungen begrenzt (HERSH et al., 1982)

1.1.3. Zellwandfraktionen

1.1.3.1. "Cell Wall Skeleton"

Bei der "Cell Wall Skeleton"-Fraktion (CWS) handelt es sich um ein Peptidoglykolipid, das für den Adjuvans-Effekt der Mykobakterien verantwortlich ist. CWS wird in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion vor allem in der Tumorthherapie verwendet (YAMAMURA und AZUMA, 1982).

1.1.3.2. "Cord-Faktor"

Ein weiterer aus Mykobakterien isolierter Stoff ist das als "Cord-Faktor" bezeichnete Glykolipid Trehalose-Dimycolat (BEKIERKUNST et al., 1969).

Antinfektiöse, antiparasitäre und antitumorale Aktivitäten des "Cord-Faktors" und synthetischer Analoga sind von YARKONI und BEKIERKUNST (1976), PARANT et al. (1978), CLARK (1979) und OLDS et al. (1980) beschrieben worden. Die Wirkung des "Cord-Faktors" beruht auf der Aktivierung von Makrophagen (YARKONI et al., 1977). Synthetisch hergestellte "Cord-Faktoren" sind bei Maus und Ratte nicht toxisch und weisen die gleichen biologischen Eigenschaften auf wie die aus Mykobakterien isolierten Substanzen (LEDERER, 1982).

1.1.3.3. "Water Soluble Adjuvant"

Die Suche nach noch kleineren immunologisch aktiven Fraktionen der Mykobakterienzellwand führte zur Isolierung einer wasserlöslichen Struktur, dem "Water Soluble Adjuvant" (WSA) (ADAM et al., 1972). Der chemischen Natur nach handelt es sich um ein Arabinogalakton, das an ein Peptidoglykan gekoppelt ist.

Ein analoger Bestandteil konnte auch aus der Zellwand von *Nocardien* isoliert werden (BONA, 1979).

1.1.3.4. Muramyl-Dipeptid

Ein weiteres Aufbrechen der WSA-Struktur führte zur kleinsten immunologisch aktiven Untereinheit der mykobakteriellen Zellwand, dem auch synthetisch herstellbaren Muramyl-Dipeptid (MDP). Dieses Glykolipid enthält ein bakterien-spezifisches Kohlenhydrat, zwei Aminosäuren, das L-Alanin und das D-Isoglutamin, und die Muramylsäure (N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamin) (LEDERER, 1980).

Die Vielzahl der biologischen Aktivitäten von MDP in vivo und in vitro sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt.

Die Anwendung von MDP ist jedoch nicht frei von Nebenwirkungen. Es kann ebenso wie einige seiner Derivate durch Freisetzung von Pyrogenen aus Granulozyten heftige Fieberreaktionen hervorrufen (DINARELLO et al., 1978). Deshalb wurden bis jetzt mehrere 100 MDP-Analoga synthetisiert, mit dem Ziel, das am besten geeignetste Derivat für den klinischen Gebrauch zu selektieren (CHEDID und AUDIBERT, 1984). Ein Butylester-Derivat, Murabutid genannt, erwies sich dabei als Produkt ohne pyrogene Aktivitäten, aber mit gleichbleibender immunstimulierender Eigenschaft (CHEDID et al., 1982 a).

Tabelle 1

Biologische Aktivitäten von MDP in vivo (modifiziert nach KOTANI et al., 1982; CHEDID et al., 1982 b, PARANT, 1980)

- I Stimulierung der Immunantwort
 - a) Potenzierung der antikörpervermittelten Immunität
 - Steigerung des Serum-IgG₂-Spiegels bei Meerschweinchen
 - Steigerung des Serum-IgG₁-Spiegels bei Mäusen
 - Steigerung des IgE-Spiegels bei Mäusen
 - T-Helferzellaktivität
 - b) Potenzierung der zellvermittelten Immunität
 - Induktion zytotoxischer T-Zellen
 - c) Hemmung der antikörpervermittelten Immunität
 - Hemmung der IgE-Antwort bei Mäusen
- II Stimulierung des RES
- III Induktion einer Monozytose
- IV Steigerung der unspezifischen Abwehr gegen mikrobielle und parasitäre Infektionen und Tumorstadium im Tierversuch
 - a) Mikrobielle Infektionen
 - Klebsiella pneumoniae
 - Pseudomonas aeruginosa
 - Salmonella typhimurium
 - Streptococcus pneumoniae
 - Listeria monocytogenes
 - Candida albicans
 - b) Parasitäre Infektionen
 - Trypanosoma cruzi
 - Toxoplasma gondii
 - c) Tumorstadium
 - Induktion aktivierter Makrophagen
 - Induktion der NK-Zellen

Tabelle 2

Biologische Aktivitäten von MDP in vitro (modifiziert nach KOTANI et al., 1982; CHEDID, 1983)

- I Stimulierung der zellulären Immunantwort
 - a) Monozyten und Makrophagen
 - Chemotaktische Aktivität
 - Hemmung der Migration
 - Steigerung der Prostaglandin und -Kollagenaseproduktion
 - Steigerung der cAMP-Produktion
 - Stimulation der lysosomalen Enzymfreigabe
 - Steigerung der phagozytischen und bakteriziden Aktivität
 - Stimulation der Sekretion von Monokinen: CSF, LAF, Fibroblasten-aktivierender-Faktor
 - B-Zellaktivierender Faktor
 - b) B-Lymphozyten
 - Mitogen
 - Polyklonale Aktivierung
 - Steigerung der antigenspezifischen Antikörperbildung
 - c) T-Lymphozyten
 - Mitogen
 - Steigerung der T-Helferzellfunktion
 - Stimulierung der Differenzierung
 - Induktion der zytotoxischen Effektorzellen
 - Stimulation der Mixed Lymphocyte Reaction
 - d) Neutrophile Leukozyten
 - Stimulierung der Phagozytose
 - e) Thrombozyten
 - Freigabe von Serotonin
- II Aktivierung des Komplements auf alternativen und klassischen Weg

1.2. Bacterionema matruchotii

Butanol-extrahiertes wasserlösliches Adjuvans (Bu-WSA) ist eine kohlenhydratreiche Substanz, die aus *Bacterionema matruchotii* isoliert wurde.

Bu-WSA, als Adjuvans, steigert die Antikörperbildung bei Mäusen und die Phagozytose-Aktivität des RES (NITTA et al., 1978). Es stimuliert die proliferative Zellantwort und polyklonale B-Zell-Antikörper-Synthese in vitro (OKUMARA et al., 1981). Die beschriebenen Effekte lassen sich nicht auf den Peptidoglykanteil der Zellwand zurückführen (NITTA et al., 1980). In tierexperimentellen Untersuchungen steigert Bu-WSA die unspezifische Abwehr gegenüber einer Infektion mit *Salmonella typhimurium*, aber nur, wenn der Extrakt vor der Infektion appliziert wird. Darüberhinaus kann Bu-WSA die Interferonbildung induzieren (NAKANO et al., 1982).

1.3. Listeria monocytogenes

Hitzeinaktivierte Listerien oder Zellwandfraktionen von Listerien (LCWF) führen zu einer Verbesserung der humoralen Immunantwort, gemessen anhand der Antikörperbildung gegen Schafer erythrozyten (SRBC). Beide Substanzen reagieren als polyklonale B-Zell-Aktivatoren (CAMBELL et al., 1975; COHEN et al., 1975). LCWF induziert die Chemotaxis polymorphkerniger Leukozyten, aktiviert das alternative Komplementsystem (BAKER et al., 1977) und die zytotoxisch wirkenden Makrophagen (CAMBELL et al., 1979). NAKANE und MINIGAWA (1981) beschrieben die Induktion von α - und γ -Interferon in vitro durch bestimmte Listerienpräparationen.

Auf der Steigerung der zellvermittelten Zytotoxizität und der Stimulierung zytotoxisch gegen Tumorzellen wirkender Makrophagen beruht wahrscheinlich die antitumorale

Wirkung der Listerien (SAIKI et al., 1982; KAMISANGO et al., 1982).

Die Verabreichung lebender, virulenter Organismen von *Listeria monocytogenes* stimuliert eine vorwiegend zelluläre Immunantwort. Daraus resultiert eine gesteigerte Produktion von Lymphokinen und anderen löslichen Mediatoren, und ein Anstieg der NK-Zellaktivität (KEARNS und LEU, 1984).

1.4. Micropolyspora faeni

Micropolyspora faeni, eine thermophile Spezies der Ordnung Actinomycetales, aktiviert das Komplementsystem, sowohl über den alternativen (SMITH et al., 1978) wie klassischen Weg in Abwesenheit spezifischer Antikörper (MARX et al., 1980). Diese Aktivität wird der Zellwandfraktion, speziell dem Peptidoglykananteil, zugesprochen. Eine ungereinigte Zellwandfraktion ist auch als unspezifisches B-Zell-Mitogen aktiv (SMITH et al., 1980).

SCHORLEMMER et al. (1977) bewiesen anhand der erhöhten Syntheserate und Sekretion lysosomaler Enzyme, daß nach Anwendung von *Micropolyspora faeni*-Keimen die Peritonealmakrophagen von Mäusen aktiviert werden. Eine gereinigte Zellwandfraktion stimuliert auch Alveolarmakrophagen mit erhöhter Freigabe des "Macrophage Chemotactic Factor" (MCF), der verantwortlich ist für die Chemotaxe bei polymorphkernigen Leukozyten (LEARN und SNYDER, 1983).

1.5. Laktobazillen

Die Applikation von vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten Laktobazillen, speziell *Laktobazillus plantarum*, beim Tier löste eine "Delayed Type Hypersensitivity" aus und verstärkte die Antikörperproduktion gegenüber Schafer-

throzyten (SRBC) (BLOKSMA et al., 1979). Laktobazillen aktivieren das mononukleare Phagozytensystem und steigern dosisabhängig die NK-Zell-Zytotoxizität (BLOKSMA et al., 1981).

Eine industriell hergestellte Mistelzweigpräparation, aus der nach erfolgter Fermentation *Laktobazillus plantarum* und *Laktobazillus brevis* isoliert werden konnte, ist bereits unter der Bezeichnung Iscador^R verfügbar (MÜLLER und SONNENSCHNEIN, 1985).

Unter den verschiedenen Arten der Gattung *Laktobazillus* hat die Spezies *Laktobazillus casei*, ein apathogener Bewohner des Darmtrakts bei Tieren, die stärksten paramunisierenden Eigenschaften. Die antitumorale Wirkung von *Laktobazillus casei*, an verschiedenen Tumormodellen bei der Maus aufgezeigt, äußert sich in einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums und Verlängerung der Überlebenszeit, wobei der makrophagenaktivierende Effekt eine große Rolle spielen dürfte. *Laktobazillus casei* steigert die Phagozytoseaktivität der Peritonealmakrophagen und des RES und induziert eine zytostatische Aktivität der Peritoneal-Exsudat-Zellen (KATO et al., 1981; KATO et al., 1983 a).

In Infektionsbelastungsversuchen bei der Maus mit den bakteriellen Erregern *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* lassen sich deutliche Schutzwirkungen erzielen, die auf der Makrophagenaktivierung durch sensibilisierte Lymphozyten beruhen (SAITO et al., 1980; SATO, 1984).

1.6. Streptokokken

1.6.1. Symbioflor I^R

Symbioflor I^R ist eine Aufschwemmung 10 verschiedener Stämme nichtpathogener *Streptococcus faecalis* ssp. *faecalis*-

Bakterien mit einer Konzentration von 10^7 lebenden Keimen pro ml.

Das zur oralen Anwendung bestimmte Präparat führt im Infektionsschutzversuch bei der Maus mit den bakteriellen Erregern *Salmonella typhimurium* und *Haemophilus influenza* zu einer Senkung der Mortalitätsrate und Verlängerung der Überlebenszeit. Die Schutzwirkung erklärt man sich durch den Anstieg der peritonealen neutrophilen Granulozytenzahl (RUSCH et al., 1982).

1.6.2. "OK-432"

Ein schwach virulenter *Streptococcus pyogenes*-Stamm wird in einem Spezialmedium suspendiert und durch Zugabe von Penicillin G und Erhitzen auf 45°C abgetötet. Daraus wird ein lyophilisiertes Präparat hergestellt, das unter der Bezeichnung "OK-432" (Picibanil^R) verfügbar ist (KAI et al., 1979; KONDO et al., 1982).

Eine direkte antitumorale Wirkung von "OK-432" konnte durch die Hemmung der DNS- und RNS-Synthese von Tumorzellen erklärt werden (ONO et al., 1973). Gleichermäßen wird jedoch auch die immunologische Tumorabwehr des Wirtes potenziert. Durch "OK-432" aktivierte Peritonealmakrophagen hemmten unspezifisch das Tumorzellwachstum und verlängerten signifikant die Überlebenszeit bei tumorinfizierten Ratten (ISHI et al., 1976). Wahrscheinlich produzieren die auf diese Weise aktivierten Makrophagen Immuninterferon, das in der Folge die NK-Zellen aktiviert (MATSUBARU et al., 1979; UCHIDA et al., 1982; KONDO et al., 1982). Der antitumorale Effekt ist von der strukturellen Integrität der Keimpräparation abhängig (RYOYAMA et al., 1981).

Die Stimulierung der T-Lymphozyten und T-Helferzellen nach "OK-432"-Behandlung steigert die zelluläre und humorale Im-

munantwort (KAI et al., 1979). Die Aktivierung des alternativen Komplementsystems durch "OK-432" mit einer Spaltung der C3-Komponente und Freisetzung des C3b Fragments unterstützt die Stimulation der Makrophagen (MURAYAMA et al., 1982). Die Schutzwirkung gegenüber bakteriellen Infektionen beruht nach KONDO et al. (1982) vor allem auch auf einer Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten und Makrophagen.

"OK-432" wird zur Zeit vorrangig in der Therapie von malignen Tumoren eingesetzt und soll zu Tumorregressionen und zu signifikant erhöhten Überlebensraten führen. Die intratumorale Applikation ist therapeutisch am effektivsten und weist gleichzeitig die geringsten Nebenwirkungen auf (MORIYASU et al., 1982; KONDO et al., 1982).

1.7. Staphylokokken-Protein A

Staphylokokken-Protein A (SPA) ist ein Protein, das aus den Zellwänden der meisten *Staphylococcus aureus*-Stämme isoliert werden kann.

SPA, ein äußerst wirksames Mitogen, steigert die polyklonale Antikörperproduktion der B-Lymphozyten (FORSGREN et al., 1976; BANCK und FORSGREN, 1978; RÄSÄNEN et al., 1980). In Studien, in denen auch eine T-Zellaktivität beschrieben wurde, sind jedoch Kontaminationen des SPA mit Staphylokokken-Enterotoxin A übersehen worden. Enterotoxin A ist für die T-Zellmitogenität und Induktion von Immuninterferon verantwortlich (LANGFORD et al., 1979). Hochgereinigtes SPA dagegen induziert über die B-Zellen nur Typ I-Interferon (SMITH et al., 1983), was wiederum die Stimulation der NK-Zellaktivität zur Folge hat (CATALONA et al., 1981).

Im Tierexperiment können mit SPA und hitzeinaktivierten *Staphylococcus aureus*-Präparationen signifikante Tumorre-

gressionsraten nachgewiesen werden (MATHEWS, 1981; BAY und BANDYOPADHYAY, 1983). Nach SPA-Behandlung beobachtet man einen Anstieg der IgG-Konzentration, der antitumoralen Antikörperbildung und der von Blutmonozyten vermittelten Zytotoxizität. Der exakte Mechanismus der antitumoralen Wirkung von SPA ist noch unbekannt.

1.8. Bacillus subtilis

Das Bacillus subtilis-Kulturfiltrat (BSK^R) ist ein gravimetrisch standardisiertes Produkt mit 200 mg Trockensubstanz pro ml. Im Infektionsschutzmodell an der Maus mit subkutaner Applikation von BSK^R ergibt sich bei Belastung mit E. coli eine gute Wirksamkeit, im Rotlaufmodell dagegen ein weniger deutlicher Schutzeffekt. Auch nach intranasaler Infektion mit Streptococcus pneumoniae läßt sich eine Schutzwirkung feststellen, die abhängig ist von der Optimierung des Intervalls zwischen Vorbehandlung und Belastungsinfektion (PETZOLDT, 1982).

Aus Feldversuchen sind unterschiedliche Ergebnisse bekannt. Eine Behandlung mit BSK^R vor dem Abferkeltermin verbessert den Puerperiumsverlauf von Sauen (SCHREIBER, 1982). Bei Kälbern vor dem Verkauf über Kälbergroßhandlungen eingesetzt, läßt sich eine signifikante Senkung der Todesrate beobachten (MÜLLER und SONNENSCHN, 1985). Nach LANG (1983) bringt dagegen die Anwendung des Kulturfiltrats bei Kälbern während der Vermarktung keine Abnahme der Morbiditätsrate.

1.9. Propionibakterien

Das seit 1964 durch HALPERN als Immunstimulans eingeführte anaerobe Corynebacterium parvum gehört zu der Gruppe der Propionibakterien, von denen besonders Propionibacterium

acnes, *Propionibacterium granulosum* und *Propionibacterium avidum* in lebender oder inaktivierter Form wirksam sind (KO et al., 1981). Der wirksame Bestandteil der Propionibakterien ist nach PULVERER (1982) der in der Zellwand lokalisierte Peptidoglykan-Teichonsäure-Komplex; andere Autoren (BUCK und KELLY, 1980) sehen die Effekte an den intakten Zellorganismus gebunden.

Hauptangriffspunkt der Propionibakterien ist das RES (PREVOT, 1975). Eine Hepatosplenomegalie kann nach der Applikation beobachtet werden. Die Größenzunahme dient in experimentellen Studien als Parameter der immunmodulatorischen Aktivität der entsprechenden Präparationen (KO et al., 1981; SZMIGIELSKI et al., 1982). Durch Propionibakterien aktivierte Makrophagen zeigen eine gesteigerte lysosomale Enzymproduktion und Phagozytoseaktivität in vivo und in vitro, und wirken zytostatisch und/oder zytotoxisch gegen virus- oder tumorinfizierte Zellen (BALDWIN und BYERS, 1979; KOBAYASHI et al., 1980; ROSZKOWSKI et al., 1980 a; ROSZKOWSKI et al., 1980 b).

Propionibakterien führen zu einer Anhebung der Interferonproduktion in vivo und in vitro (HIRT et al., 1978; KIRCHNER et al., 1982), einer Aktivierung der NK-Zellen (MC FARLAN et al., 1979; SCHINDLER et al., 1981) und einer Aktivierung des Komplements auf klassischem wie alternativem Weg (MC BRIDE et al., 1975).

Das Spektrum der ausgelösten Aktivitäten ist dabei vom Zeitpunkt der Applikation, von der Dosis, der verwendeten Bakterienart und besonders der Applikationsart abhängig (PULVERER, 1982). So wird die zelluläre Immunantwort bei parenteraler Gabe supprimiert, gemessen anhand der Hemmung der 'Delayed Type Hypersensitivity' (SCOTT, 1974), der 'Graft Versus Host Reaction' (SCOTT, 1972) und

der zellvermittelten Zytotoxizität (LICHTENSTEIN et al., 1980). Dafür verantwortlich soll die erhöhte Aktivität von Suppressor-T-Zellen und Suppressor-Makrophagen sein (LICHTENSTEIN et al., 1981). Auf der anderen Seite fördert eine subkutane Gabe die zelluläre Immunantwort (SCOTT, 1975).

Die humorale Immunantwort, sowohl auf T-Zell-abhängige (JAMES et al., 1974), wie -unabhängige Antigene wird potenziert, entweder auf Grund einer Interaktion von B-Lymphozyten mit Makrophagen (HOWARD et al., 1973), einer entsprechend günstigen Antigenpräsentation auf der Makrophagenoberfläche (WIENER und BANDIARDI, 1975), oder einer direkten B-Zellstimulation ohne Beteiligung von T-Helferzellen (HALPERN, 1975).

Antitumorale Wirkung zeigen Propionibakterien sowohl im Tierexperiment an Mammarkarzinomen, Osteosarkomen und einer Reihe weiterer Neoplasien (GATENBY und RASTEN, 1980; BARTLETT et al., 1980; MATHEWS, 1981; ROSZKOWSKI et al., 1980 c), als auch in klinischen Studien (MAYR et al., 1979). Die Effizienz der Tumorthherapie ist abhängig von Tumorart, Tumorlokalisation und begleitender Chemotherapie (ROSZKOWSKI et al., 1982). GIL et al. (1982) setzten die lokale Immunmodulation mit Propionibakterien auch bei hartnäckigem Morbus Crohn mit Erfolg ein.

Während die tumorhemmende Wirkung hauptsächlich bei lokaler Verabreichung zum Ausdruck kommt, lassen sich antibakterielle und antivirale Schutzeffekte lediglich bei parenteraler Applikation feststellen (PULVERER, 1982) (siehe Tabelle 3). Neben den vielen positiven Effekten führen Propionibakterien nach Anwendung beim Mensch zu zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen. Nach parenteraler Gabe wurden starke Fieberreaktionen, Schüttelfrost, Nausea, Kopf-, Gelenk- und Gliederschmerzen sowie Blutdruckanstieg beobachtet (OETTGEN et al., 1976).

Tabelle 3

Stimulierung der unspezifischen Abwehr gegen bakterielle, virale und parasitäre Infektionen durch Paramunisierung mit Propionibakterien im Tierexperiment

Bakterielle Erreger	Autor
Klebsiella pneumoniae	KOBAYASHI et al., 1980
Staphylococcus aureus	" "
Streptococcus pyogenes	" "
Salmonella enteritidis	COLLINS und SCOTT, 1974
Listeria monocytogenes	SCHWARTZBERG et al., 1975
Virale Erreger	
Herpes simplex-Virus Typ 1	KIRCHNER et al., 1978
Herpes simplex-Virus Typ 2	GABRIELSON et al., 1980
Maus-Zytomegalie-Virus	GLASGOW et al., 1977
Encephalomyocarditis-Virus	" "
Semliki-Forest-Virus	" "
Junin-Virus	BUDZKO et al., 1978
Influenza-Virus	GANGEMI et al., 1983
Maus-Hepatitis-Virus	SCHINDLER et al., 1981
Vaccinia-Virus	SZMIGIELSKI et al., 1980
Parasitäre Erreger	
Plasmodium sp.	CLARK et al., 1977
Babesia sp.	" "
Trypanosoma cruzi	BRENER und CARDOSO, 1976
Trichinella spiralis	BANY et al., 1984

2. Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit gramnegativen Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten

2.1. Bordetella pertussis

Von den vielen biologisch aktiven Komponenten, die *Bordetella pertussis* besitzt, ist der Lymphocytosis Promoting Factor (LPF) als T-Zellmitogen für Mäuselymphozyten und Adjuvans zur Steigerung der Antikörperbildung bekannt. Durch Applikation von LPF bei der Maus kommt es sowohl zu einer unspezifischen Aktivierung der T-Helferzellen, sogar ohne vorherige Antigenstimulierung mit SRBC, als auch zu einem Anstieg von Memory-Zellen mit T-Helferzell-Aktivität. Weiterhin vermag LPF auch Suppressor-T-Zellen im Frühstadium der Antikörperbildung zu aktivieren (HO et al., 1980; KUMAZAWA et al., 1982).

Bordetella pertussis induziert auch die Interferonproduktion (BORECKY und LACKOVIC, 1967). Eine intravenöse Injektion einer Pertussis-Vaccine (BPV) bei der Maus induziert einen biphasischen Anstieg der lysosomalen Enzymaktivität. Man nimmt an, daß das Pertussis-Endotoxin der BPV die Makrophagen in der Frühphase der Aktion direkt zur Enzymproduktion veranlaßt, und eine andere Vaccinekomponente durch Aktivierung der T-Lymphozyten für den zweiten Enzympeak verantwortlich ist (KLEIN et al., 1982). Beim Einsatz in der Tumorthherapie wird von unterschiedlichen Resultaten berichtet. In einigen Studien konnte eine antitumorale Wirkung von BPV festgestellt werden, in anderen dagegen eine geringe oder keine Wirkung. Mäuse sind nach intraperitonealer BPV-Behandlung gegen eine Infektion mit Herpes simplex-Virus bis zur 100-fachen LD₅₀-Dosis signifikant geschützt (KIRCHNER et al., 1978).

Toxische Begleiterscheinungen der Pertussisbakterien, vor allem verursacht durch ihren Histamine Sensitizing Factor,

sind eine verstärkte Empfindlichkeit auf Histamin und Serotonin, eine Leukozytose und Hypoglykämie (STEWART-TULL, 1983; ENDOH et al., 1983; EICHELBERG und SCHMUTZLER, 1983).

2.2. Brucella abortus

1964 demonstrierten STINEBRING und YOUNGNER, daß die intravenöse Applikation lebender Zellen von *Brucella abortus* eine Interferonproduktion induziert. BILLIAU et al. (1970) wiesen nach, daß auch inaktivierte Brucellenpräparate hohe Interferontiter bei der Maus stimulieren und Versuchstiere gegen eine Infektion mit Vaccinia-Virus schützen. YOUNGNER et al (1974) gelang es einen Wasser-Äther-Extrakt von *Brucella abortus*, "Bru-Pel" genannt, zu isolieren, der in der Wirkung dem intakten Bakterium gleicht, jedoch ohne toxische Nebeneffekte bleibt. In der Folge wurden Schutzwirkungen von "Bru-Pel" nachgewiesen gegenüber verschiedenen viralen Infektionen (YOUNGNER et al., 1974; KERN et al., 1976), Neoplasien (SCHULTZ et al., 1978 a; GLASGOW et al., 1978; STYLOS et al., 1978; GLASGOW et al., 1979) und gegen eine *Listeria monocytogenes*-Infektion (GLASGOW et al., 1979). Eine "Bru-Pel"-Behandlung bei tumorinfizierten Mäusen führt zu einer ausgeprägten Splenomegalie und einer signifikanten Reduktion von T- und B-Lymphozyten in der Milz (STYLOS et al., 1978). Neben der Fähigkeit der Interferoninduktion vom Typ I ist auch die makrophagenaktivierende Funktion von "Bru-Pel" für den immunstimulierenden Effekt verantwortlich (SCHULTZ et al., 1978 b; GLASGOW et al., 1979).

2.3. Klebsiella pneumoniae

Aus einem Lysat von *Klebsiella pneumoniae*, Serotyp 01K2, wurde durch Methanol-Azeton-Extraktion eine lipidfreie

Glykoproteinfraktion gewonnen, die die Bezeichnung "Biostim" erhalten hat.

"Biostim" steigert die humorale und zellvermittelte Immunität, die Phagozytoserate der polymorphkernigen Leukozyten und stimuliert die Makrophagentätigkeit. Nach Reinigung von "Biostim" erhält man zwei Hauptfraktionen (P_1 und F_1), von denen die F_1 -Fraktion die biologisch aktive ist (TAKADA et al., 1982; GRISCELLI et al., 1982). Die F_1 -Fraktion vermag sowohl die NK-Zellaktivität (GRISCELLI et al., 1982), als auch die "Delayed Type Hypersensitivity" zu steigern (SMETS, 1984).

Prophylaktisch verabreicht schützt "Biostim" Versuchstiere gegen bakterielle Infektionen mit den Erregern *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, gegen eine Pilzinfektion mit *Candida albicans* und gegen Infektionen mit Encephalomyocarditis-Virus und Influenza-Virus. Bemerkenswert ist, neben dem Ausbleiben toxischer Nebeneffekte, daß die Schutzwirkung teilweise auch nach oraler Applikation erhalten blieb, und daß im Influenza-Virus-Modell die Aerosolbehandlung effektiver war als die systemische (GRISCELLI et al., 1982; SMETS, 1984).

Neben der Glykoproteinpräparation "Biostim" wurde von *Klebsiella pneumoniae* auch eine polysaccharidreiche Fraktion (CPS-K) mit interferoninduzierender Aktivität (KATO et al., 1975) und außerordentlich starker Adjuvanswirkung extrahiert. Zuerst stimuliert CPS-K die antigen-spezifischen T-Helferzellen in der Frühphase der Immunisierung und später, als polyklonaler B-Zellaktivator, die antigenunspezifischen B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung (NAKASHIMA et al., 1982).

CPS-K wurde weiter aufgespalten in eine saure Polysaccharidfraktion, die dem typspezifischen Kapselantigen K1 entspricht, und eine neutrale Polysaccharidfraktion (LPS), dem Klebsiella 03-Antigen. Die aktive Komponente ist das Klebsiella 03-LPS, wobei die Lipid A-assoziierten Proteine des LPS nicht zur Adjuvanswirkung beitragen (KATO et al., 1983 b). Klebsiella 03-LPS induziert die 'Delayed Type Hypersensitivity' gegenüber Proteinantigen und die Sekretion von Interleukin 1, dem makrophagenabhängigen lymphozytenaktivierenden Faktor (KIDO et al., 1984).

2.4. Pseudomonas aeruginosa

MATHE et al. (1977) untersuchten die Adjuvanswirkung von hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa*-Keimen. Sie steigern die humorale Immunantwort, aktivierten die Peritonealmakrophagen, die zytostatisch auf Tumorzellen wirken, und steigern die Überlebenszeit tumorinfizierter Mäuse, wobei der antitumorale Effekt mit der Anzahl der injizierten Bakterien und der Applikationszeit korreliert.

CHEN et al. (1980) isolierten 3 Zellwandproteine von *Pseudomonas aeruginosa*, die spezifisch als B-Zellmitogene wirken. Von einer Stimulierung der alternativen Komplementaktivierung durch ein Glykolipoprotein von *Pseudomonas aeruginosa* berichten LAMBRIS et al. (1982).

In klinischen Studien wurde nach Behandlung mit einer *Pseudomonas aeruginosa*-Präparation bei 50 % anergischer Krebspatienten die 'Delayed Type Hypersensitivity'-Reaktion wiederhergestellt (MATHE, 1980).

2.5. Mykoplasmen

Eine Reihe von Mykoplasmenarten sind als Mitogene für Lymphozyten verschiedener Tierarten bekannt. *Mykoplasma pneumoniae*, *Mykoplasma neurolyticum* und *Acholeplasma laidlawii* stimulieren B-Zellpopulationen (BIBERFELD und GRONOWICZ, 1976; KIRCHNER et al., 1977; NAOT et al., 1979 a), *Mykoplasma pulmonalis* sowohl B- als auch T-Zellpopulationen (NAOT et al., 1979 b). In Studien, die mit *Mykoplasma arthritidis* durchgeführt wurden, ließ sich die T-Zellaktivierende Komponente aus dem Überstand von Bouillon-Kulturen isolieren (COLE et al., 1982).

Neben der direkten Aktivierung der Makrophagen durch Mykoplasmen, scheint auch ein von aktivierten Lymphozyten stammendes Lymphokin zur Mitogenwirkung beizutragen. Die Aktivierung der Makrophagen nach Verabreichung von Mykoplasmen-Antigen erhöht die antitumoralen Eigenschaften und die in vitro Abtötungsrate von Listerien (COLE, 1983).

Mykoplasmen induzieren die Bildung von Interferon in vivo und in vitro (RINALDO et al., 1974). BECK et al. (1982) definierten das Mykoplasmeninduzierte Interferon als IFN α , wohingegen COLE und THORPE (1983) auch IFN γ nachweisen konnten.

2.6. Lipopolysaccharide

Das Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien, trägt in sich das O-Antigen und die endotoxische Aktivität. Es besteht aus drei Regionen. Region 1 enthält das serotypspezifische O-Antigen, Region 2 die Polysaccharidkomponente und die Region 3 den Glykolipidanteil, der aus dem Lipid A und einem Trisaccharid-2-Keto-3-Deoxyoktonat besteht (ZINNER und PETER, 1983).

Sowohl der Lipid A-Teil, der für die endotoxische Aktivität verantwortlich ist (GALANOS, 1975), als auch die Polysaccharidfraktion sind für die immunmodulatorischen Eigenschaften des LPS wichtig (NOWOTNY et al., 1982; VOGEL et al., 1984). Die B-Zellpopulation scheint ein Hauptangriffspunkt des LPS zu sein. LPS wirkt als B-Zell-mitogen und polyklonaler B-Zellaktivator (SKIDMORE et al., 1975; ZABALA und LIPSKY, 1982). Es steigert die B-Lymphozytensensibilität gegenüber T-Helferfaktoren; auch ein hemmender Effekt auf T-Suppressorzellen ist nachgewiesen worden (VIOUCULESCU et al., 1982). Hilfestellung bei der Antigenverarbeitung gibt das LPS durch die Fähigkeit zur Komplementaktivierung, sowohl auf dem klassischen wie alternativen Weg. Von maßgebender Bedeutung für den Adjuvanseffekt ist die Beobachtung, daß eine LPS-Gabe nach Antigeninjektion die Immunantwort steigert, wogegen eine LPS-Vorbehandlung die Antikörperproduktion supprimiert (HADDEN et al., 1977).

Nach LPS-Applikation werden Makrophagen direkt aktiviert (JONES et al., 1984). Die Makrophagen proliferieren dann, wirken zytotoxisch und erhöhen die Sekretion von Monokinen. So gibt es eine LPS-induzierte Produktion von CSF (MOORE et al., 1980), eine erhöhte Freigabe lysosomaler Enzyme, sowie des LAF. Der LAF wiederum induziert die Proliferation der T-Lymphozyten, fördert die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten und die Differenzierung von T-Lymphozyten in T-Helferzellen (FRIEDMAN et al., 1984). Weiterhin agiert LPS als Interferoninduktor (HADDEN et al., 1977) und NK-Zellaktivator (NOWOTNY et al., 1982).

Der Resistenzsteigerung durch LPS, demonstriert an verschiedenen experimentellen Infektionen am Tier (Parasiten, Pilze, Viren und Bakterien) (CLUFF, 1970), geht jedoch eine dosisabhängige "negative Phase" mit einer er-

höhten Empfänglichkeit für Infektionen voraus (MAYR et al., 1984). UCHIYAMA und JACOBS (1978) wiesen nach, daß LPS Suppressor-B-Zellen in der Milz aktivieren kann, die die Antikörperbildung gegen ein bestimmtes Antigen unterdrücken.

Von Bedeutung sind die direkten antitumoralen Effekte des LPS. In Tumoren gewisser Größe verursacht LPS Hämorrhagien und Nekrosen. Ausgehend von der Beobachtung, daß diese Irritationen dem lokalem Shwartzman-Phänomen und der Arthus-Reaktion ähneln, wird die Induktion einer LPS-vermittelten Antigen/Antikörperreaktion mit Komplementaktivierung im Tumor diskutiert. Daneben werden direkte Wirkungen des LPS auf das tumorale Gefäßsystem vermutet, und zwar mittels Freisetzung von dem Tumor Necrotizing Factor oder Tumor Angiogenesis Factor (KODAMA et al., 1982). Das antitumorale Wirkprinzip liegt nach FUKUSHI et al. (1982) in der Glykolipidfraktion des LPS, wobei angenommen wird, daß die Anwesenheit des Lipid A-Teils nicht notwendig ist.

Einem therapeutischen Nutzen steht allerdings die unakzeptable Toxizität gegenüber (Stoffwechselstörungen, Pyrogenität, anaphylaktische Reaktionen (MAYR et al., 1984)). Die Entwicklung nicht-toxischer LPS- und Lipid A-Analoga steht in ihren Anfängen (KOTANI et al., 1983).

2.7. Dodekoral

Dodekoral ist ein polyvalenter Enteritis-Oral-Impfstoff, der sich aus den hitzeinaktivierten Vollantigenen von 6 Salmonella-Stämmen, 2 Shigella-Stämmen und 4 enteropathogenen E. coli-Stämmen zusammensetzt.

Im Mäuseschutztest kann nach oraler Gabe des Impfstoffs nicht nur ein guter spezifischer Schutz und ein Adjuvanseffekt, sondern auch eine Schutzwirkung gegenüber

Infektionen mit anderen Enterobacteriaceen, die nicht im Impfstoff enthalten sind, festgestellt werden. Nach 10-maliger oraler Paramunisierung mit Dodekoral sind Mäuse gegenüber einer oralen Infektion mit dem Parapoliomyelitis-Virus Columbia-SK geschützt. Es wird vermutet, daß in diesem Modell die Interferoninduktion eine wichtige Rolle spielt (RAETTIG, 1979; RAETTIG, 1982).

2.8. Symbioflor II^R

Symbioflor II^R ist eine Aufschwemmung von 10 verschiedenen, apathogenen E. coli-Stämmen mit einer Keimkonzentration von 10^7 lebenden Keimen pro ml.

Das zur oralen Anwendung bestimmte Präparat erhöhte im Tierexperiment die Schutzwirkung gegenüber Infektionen mit E. coli und Haemophilus influenza (RUSCH et al., 1982). Die Behandlung mit Symbioflor II^R führte auch zu einer geringfügigen Steigerung der Milzgewichte und der Leukozytenzahl im Blut (MÜLLER und SONNENSCHNEIN, 1985).

2.9. Symbioflor Antigen A^R

Symbioflor Antigen A^R ist eine Aufschwemmung von 11 R-Stämmen apathogener, hitzeinaktivierter E. coli-Keime humaner Herkunft mit einer Keimkonzentration von 10^8 pro ml.

Die subkutane Behandlung von Mäusen mit Symbioflor Antigen A^R führt zu einer signifikanten Senkung der Mortalitätsrate nach oraler Infektion mit Salmonella typhimurium.

Bei in vitro-Versuchen konnte eine Erhöhung der bakteriziden bzw. bakteriostatischen Aktivität des Blutes behandelter Mäuse gegenüber E. coli und Listeria monocytogenes nachgewiesen werden. Für die bakterizide Aktivität

sollen aktivierte Leukozyten verantwortlich sein. Anhand von Vitalfärbungen zeigt sich eine erhöhte Phagozytosekapazität der neutrophilen Granulozyten gegen *Salmonella typhimurium* (RUSCH et al., 1982).

3. Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit Kombinationspräparaten gramnegativer und grampositiver Bakterien

3.1. Broncho-Vaxom^R

Broncho-Vaxom^R ist ein lyophilisiertes Bakterienlysät, bestehend aus folgenden bei Atemwegsinfektionen gehäuft vorkommenden Keimarten: *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Neisseria*.

Oral verabreicht ist Broncho-Vaxom^R in mehreren Doppelblindstudien zur Anwendung gekommen. LOSA und MAESTRONI (1984) beschreiben bei Patienten mit rezidivierenden Infektionen der oberen Atemwege eine signifikante Erhöhung der allogenen Mixed Lymphocyte Reaction, begleitet von einer Abnahme der Anzahl der Infekte, wobei diese klinische Wirkung mit der Mixed Lymphocyte Reaktion positiv korreliert war. Da der Effekt nach oraler Verabreichung erzielt wurde, liegt der Schluß nahe, daß das Bakterienlysät über eine Wirkung auf das lymphatische Gewebe des Darms defekte Immunfunktionen wiederherstellt. Ähnliche Beobachtungen machten AHRENS und WIEDENBACH (1984), KELLER (1984) und GIRARD und FLEURY (1979), die eine Stimulation der zellvermittelten Immunität feststellten, nachgewiesen durch die Potenzierung der T-Lymphozytenreaktion auf verschiedene Mitogene. Bei mit Broncho-Vaxom^R behandelten Testpersonen zeigte sich außerdem eine Erhöhung von sekretorischem IgA im Speichel und von IgM im Serum (PUIGDOLLERS et al., 1980).

3.2. IRS-19^R

IRS-19^R ist ein polyvalenter Lysatimpfstoff, der 19 Bakterienstämme enthält, die am häufigsten als pathogene Keime bei Infektionen der oberen Luftwege des Menschen isoliert werden. Dazu gehören mehrere Streptococcus-, Klebsiella-, Moraxella-, Haemophilus-, Neisseria- und Gaffkya-Stämme.

Im Tierexperiment bei der Maus konnte eine Steigerung der Phagozytoserate von Makrophagen, eine Steigerung der Lysozymproduktion und eine Interferoninduktion nach Inhalationsimpfung mit IRS-19^R nachgewiesen werden. Aerosolvorbehandelte Mäuse sind vor einer nasalen Infektion mit virulentem Influenza-Virus geschützt (RAETTIG, 1976; RAETTIG, 1982). Dagegen wird in einem Infektionsbelastungsversuch mit Rotlauf keine Wirkung erzielt (PETZOLDT, 1982).

3.3. Diribiotine

Diribiotine ist eine Lysatmischung aus 9 Bakterienstämmen der Gattungen Escherichia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Enterococcus, Staphylococcus und Streptococcus. Die Keimlyse wurde durch den Zusatz von Bakteriophagen erreicht. Die so gewonnene multibakterielle Extraktion enthält die zellulären Bruchstücke der Keime und die lebenden Phagen, die zur Wirkung des Diribiotines aber nicht beitragen.

Für die immunstimulierende Aktivität sind hauptsächlich die Monolysate der gramnegativen Bakterien, vor allem von E. coli, Klebsiella und Salmonella verantwortlich. Diribiotine aktiviert Makrophagen in vivo und in vitro, und T-Lymphozyten. Ebenso konnte eine durch T-Helfer- und T-Suppressorzellen vermittelte Beeinflussung des B-Zellsystems beobachtet werden.

Mit Diribiotine intraperitoneal vorbehandelte Versuchstiere waren gegen eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* geschützt.

Diribiotine besitzt keine Antigenität, noch führen häufige Verabreichungen zu Überempfindlichkeitsreaktionen. Toxische Nebenwirkungen und medikamentöse Inkompatibilitäten wurden nicht beobachtet (NOUGAYREDE, 1980).

4. Zusammenstellung der bakteriellen Substanzen mit paramuniserender Wirkung

Bakteriengattung		wirksame Substanz	Präparat
Mycobacterium	BCG	ganze Zelle	
	MER	Zellwandfraktion	
	CWS	Peptidoglykolipid	
	Cord-Faktor	Glykolipid	
	WSA	Peptidoglykan	
	MDP	Glykolipid	
Nocardia	WSA	Peptidoglykan	
Bacterionema	matruchotii	Zellwandfraktion	
Micropolyspora	faeni	Zellwandfraktion	
Listeria	monocytogenes	Peptidoglykan	
Lactobacillus	plantarum	ganze Zelle	Iscador ^R
	brevis		
	casei	ganze Zelle	
Streptococcus	pyogenes	ganze Zelle	"OK-432" ^R Picibanil ^R
	faecalis ssp	ganze Zelle	Symbioflor I ^R
	faecalis		
Staphylococcus	aureus	Proteinfraktion	
Bacillus	subtilis	Kulturfiltrat	BSK ^R

Bakteriengattung	wirksame Substanz	Präparat
Propionibacterium acnes	Peptidoglykan- Teichonsäure- Komplex	
granulosum		
avidum		
Bordetella pertussis	Endotoxin	
	LPF	
Brucella abortus	Zellextrakt	"Bru-Pel"
Klebsiella pneumoniae	Glykoprotein	"Biostim"
	Endotoxin	
Pseudomonas aeruginosa	ganze Zelle	
	Zellwandproteine	
Mycoplasma sp.	Überstand aus Bouillon-Kultur	
Salmonella, Shigella, Escherichia	ganze Zellen	Dodekoral
Escherichia coli	ganze Zellen	Symbioflor II ^R
		Symbioflor- Antigen A ^R
Haemophilus, Klebsiella, Neisseria, Streptococcus, Staphylococcus	ganze Zellen	Broncho- Vaxom ^R
Klebsiella, Moraxella, Haemophilus, Neisseria, Streptococcus, Gaffkya	ganze Zellen	IRS-19 ^R
Escherichia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Enterococcus, Staphylo- coccus, Streptococcus	Zellextrakte	Diribiotine

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche NMRI-Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 18 bis 20 Gramm bei Versuchsbeginn verwendet. Sie wurden in Makrolonkäfigen gehalten und mit Trockenfutter (Altromin^R) und Leitungswasser ad libitum gefüttert. Eine Versuchsgruppe setzte sich aus jeweils 10 Einzeltieren zusammen.

1.2. Herstellung bakterieller Paramunitätsinducer

1.2.1. Bakterienstämme

Zur Herstellung der Paramunitätsinducer wurden entweder Bakterienstämme aus der institutseigenen Stammsammlung oder aus der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSM) benutzt. Im einzelnen handelte es sich um folgende Stämme:

- a) *Bordetella bronchiseptica* Nr. 2 (institutseigene Stammsammlung)
- b) *Salmonella typhimurium* L₁ (institutseigene Stammsammlung)
- c) *Clostridium propionicum* (DSM: Nr. 1682)
- d) *Propionibacterium acnes* (DSM: Nr. 20458)

1.2.2. Keimvermehrung

Die in lyophilisierter Form bei +4°C in Ampullen aufbewahrten Bakterien wurden in physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst und auf Blutagarplatten angezüchtet. Bordetellen und Salmonellen wurden für 24 Stunden aerob, Clostridien und Propionibakterien für 72 Stunden anaerob bei 37°C bebrütet.

Die zur Produktion der Inducer notwendigen Keimengen sind entweder durch Abschwemmung der Agarplatten mit je 5,0 ml physiologischer NaCl (Clostridien, Propionibakterien) oder durch Anzüchtung im Fermenter gewonnen worden. Im Fermenter wurde das beimpfte Medium (Standard I, Merck) während der 16 bis 18stündigen Bebrütungszeit bei 37°C ständig gerührt und begast. Die Fermenterkultur wurde durch Zentrifugation (3000 UpM, 30 min) 1:10 eingeeengt und dreimal mit physiologischer NaCl gewaschen.

Nach Prüfung auf Reinheit und Spezifität mit den üblichen Methoden erfolgte die Einstellung der optischen Dichte bei den verschiedenen Keimkonzentraten (Plattenabschwemmung, Fermenterkultur) auf ca. 1 600 (Extinktionswert gemessen bei 405 nm, Multiskan Photometer Flow) mit physiologischer NaCl. Bis zur weiteren Aufbereitung wurden die Bakterien bei +4°C gelagert.

1.2.3. Hydrolyse

Die verschiedenen Keimkonzentrate wurden für die alkalische Hydrolyse mit 1 n NaOH auf pH 12,0, für die saure Hydrolyse mit 1 n HCl auf pH 2,0 gebracht. Das Eintropfen der Säure oder Lauge erfolgte langsam und unter gleichmäßigem Schütteln (Microshaker) des Konzentrats. Der pH-Wert wurde mit dem Beckmann-pH-Meter kontrolliert. Nach 24stündiger Bebrütungszeit bei 37°C unter ständigem Schütteln wurde das Keimkonzentrat durch die Zugabe von 1 n HCl (alkalische Hydrolyse) bzw. 1 n NaOH (saure Hydrolyse) neutralisiert (pH 7,2).

Anschließend wurde das Hydrolysat mit 0,3 % Formalin und 4 % Raschid versetzt und für weitere 48 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Das Raschid bestand aus einer Mischung von 970 ml Glycerin und 30 g p-Chlorm-Cresol. Die Lösung erfolgte unter Erhitzen (ca. 60°C) und unter ständigem Rühren des Glycerins.

Nach der zweitägigen Inkubation wurde der pH-Wert (7,2) kontrolliert und die üblichen Sterilitätsproben durchgeführt.

1.2.4. Thermoinaktivierung

Ein Teil der Keimsuspensionen bzw. der Hydrolysate wurden zum weiteren Aufschluß der Zellen autoklaviert (125°C, 20 min).

1.2.5. Bestrahlung

Die Bestrahlung des Hydrolysats erfolgte mit Gamma-Strahlen (Strahlendosis 1 400 krad).

1.2.6. Formalinbehandlung

Die Keimsuspensionen wurden mit 0,3 % Formalin versetzt und anschließend 48 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

1.2.7. Phenol-Wasser-Extraktion

Die Keimkonzentrate wurden auf +2°C heruntergekühlt und mit dem doppelten Volumen einer 75 %igen, bei +5°C gehaltenen Phenol-Wassermischung versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch 20 min bei +5°C inkubiert und dann bei 35 000 UpM 30 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennte sich das Gemisch in eine wäßrige Phase, die das Endotoxin enthielt, und eine Phenolphase. Die wäßrige Phase wurde durch 2tägiges Dialysieren gegen fließendes Leitungswasser und 1tägiges Dialysieren gegen Aqua dest. (4°C) gereinigt.

1.2.8. Mechanische Lyse

Das Keimkonzentrat wurde mit einem Sorvall Omnimixer (Stufe 10) 8 x 15 min lang behandelt. Während des Mixens wur-

den die Bakterien gekühlt. Die Anfangskeimzahl der Suspension von ca. 10^{11} /ml fiel durch das Mixen auf 2×10^8 Keime pro ml ab.

Ein weiteres Aufschlußverfahren der Bakterienzelle bestand in einem wechselseitigen Einfrier- und Auftauvorgang. Nach einer 13 x 30minütigen Inkubation der Keimsuspension bei -70°C mit intermittierenden Auftauphasen bei 56°C fiel die Keimzahl auf 3×10^9 /ml ab.

1.3. Herstellung viraler Paramunitätsinducer

1.3.1. PIND AVI

Der Paramunitätsinducer PIND AVI ist ein Präparat, das aus einem in Zellkulturen (primäre Hühnerembryofibroblasten, FHE) vermehrten Avipox Virus hergestellt wurde. Das Virus geht auf den Hühnerpockenstamm HP-1 zurück, der über fortlaufende Passagen in FHE-Kulturen attenuiert und nach der 438. Passage in Valo-Eiern plaquegereinigt wurde.

Nach Vermehrung des Virus in stationär bebrüteten FHE-Kulturen wurde die Virusernte durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Gamma-Strahlen bei 1 400 krad inaktiviert. Der lyophilisierte Inducer wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ in Ampullen aufbewahrt.

1.3.2. PIND ORF

Bei PIND ORF handelt es sich um einen Inducer, hergestellt auf der Basis von Gamma-bestrahlten Parapoxvirus ovis. Das Virus wurde auf sekundären BEL (bovine embryonale Lungenzellen) vermehrt und die Ernte (43. BEL-Kulturpassage) durch Gamma-Strahlen (1 600 krad) inaktiviert. Nach Zugabe von 1 % Gelatine und 1 % Glucosamin erfolgte die Gefrieretrocknung.

1.4. Applikationsmodus

Die Präparate wurden den Versuchstiergruppen (je 10 Tiere) auf drei verschiedene Arten verabreicht:

- a) intraperitoneale Applikation mit einer Dosis von 0,2 ml/Tier,
- b) subkutane Applikation am Rücken mit einer Dosis von 0,5 ml/Tier,
- c) intranasale Applikation durch Auftropfen von 0,1 ml/Tier auf die Nasenöffnungen im Ätherrausch.

Die Applikation erfolgte jeweils 24 Stunden vor der Belastung.

1.5. Wirksamkeitsnachweis

1.5.1. Belastungsmaterial

Für die Infektionsversuche bei Mäusen wurden folgende Bakterienstämme aus der institutseigenen Stammsammlung verwendet:

- a) *Pseudomonas aeruginosa*
- b) *Pasteurella multocida* (Kapseltyp E)
- c) *Listeria monocytogenes*
- d) *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- e) *Escherichia coli* (0149:K88)

Zur Herstellung der Challengesuspension wurden die Erreger auf Blutagarplatten ausgespatelt und 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Der dicht gewachsene Bakterienrasen wurde anschließend mit 3 ml physiologischer NaCl von der Platte abgeschwemmt und die Keimzahl mit Hilfe des Koch'schen Plattenverfahrens bestimmt.

Als Grundlage der Berechnung der LD₅₀ nach SPEARMAN-KÄRBER (CAVALLI-SFORZA, 1969) diente die Absterberate von Kontrolltieren, die mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Bak-

teriensuspension belastet wurden. Die LD_{50} lag bei intraperitonealer Applikation im Pseudomonas-Modell bei 3×10^8 Keimen/ml, im Listeria-Modell bei $1,2 \times 10^7$ Keimen/ml, im Escherichia-Modell bei $1,7 \times 10^9$ Keimen/ml und im Pasteurella-Modell bei $8,6 \times 10^2$ Keimen/ml. Die Belastungsdosis für die einzelnen Bakterien wurde auf ca. 5 bis $10 LD_{50}$ eingestellt.

1.5.2. Infektionsbelastungsversuch

Nach Vorbehandlung mit der zu prüfenden Substanz wurden die Versuchstiere 24 Stunden später intraperitoneal mit 0,1 ml der Challengesuspension infiziert. Die Belastungsdosis war so eingestellt, daß die Infektion bei den Kontrollgruppen, denen als Placebo physiologische NaCl verabreicht wurde, zu einer Absterberate von 80 bis 100 % führte.

Aus dem Unterschied der Mortalitätsraten von mit Inducer behandelten Tieren und Kontrollgruppen innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 10 Tagen errechnete sich der Wirkungsindex (WI) mit folgender Formel:

$$WI = \frac{b - a}{b} \times 100$$

wobei b = Mortalität der Kontrolltiere in %

a = Mortalität der Versuchstiergruppen in %.

Als wirksam galten nur Indices mit Werten über 20.

Entsprechende Verdünnungsstufen eines Präparats, bei denen der Wirkungsindex über 20 lag, dienten zur Bestimmung der sog. Dosis-Wirkungsbeziehung und der davon abgeleiteten Wirkungseinheit (WE). Die Wirkungseinheit ist definiert als Ausdruck für die infektionshemmende Potenz eines Inducers bis zu seiner Grenzverdünnung, wobei der Reziprokwert der Grenzverdünnung die Anzahl der Wirkungseinheiten pro Dosismenge ergibt.

2. Ergebnisse

Zur Entwicklung eines wirksamen Paramunitätsinducers gegen bakterielle Infektionen wurden zunächst durch Hydrolyse aufgeschlossene Bakterien auf ihre infektionshemmende Wirkung in verschiedenen Infektionsmodellen getestet. Bei den für die Herstellung der Hydrolysate verwendeten Bakterien handelte es sich im einzelnen um *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium propionicum* und *Propionibacterium acnes*. Zum Vergleich wurden die bekannten Inducer PIND AVI und PIND ORF mituntersucht. Zur Prüfung wurde jeweils 10 Versuchstieren 0,2 ml der zu testenden Substanz intraperitoneal appliziert. 24 Stunden später erfolgte die interaperitoneale Infektion. Anhand der Absterberate von behandelten Tieren und Kontrollgruppe, denen als Placebo physiologische Kochsalzlösung verabreicht wurde, wurde der Wirkungsindex (WI) errechnet. Einen Überblick über die Ergebnisse vermittelt Tabelle 4.

Nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* überlebten alle mit dem *Bordetella bronchiseptica*-, *Clostridium propionicum*-, und *Salmonella typhimurium*-Hydrolysat vorbehandelten Versuchstiere (WI = 100). Nur unwesentlich schlechter war der Wirkungsindex (84) des *Propionibacterium acnes*-Hydrolysats. Für die beiden viralen Inducer PIND AVI und PIND ORF wurden die niedrigsten Indices von 70 (PIND AVI) und 30 (PIND ORF) errechnet.

Im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell hatten das *Bordetellen*- und *Clostridien*-Hydrolysat wieder die höchsten Wirkungsindices (89 bzw. 100). Etwas niedriger lag der Index für PIND AVI (53).

Gegen eine *E. coli*-Infektion waren die mit den bakteriellen Hydrolysaten vorbehandelten Tiere am besten geschützt. Die Wirkungsindices schwankten zwischen 100 (*Salmonella*-

Hydrolysat) und 80 (Bordetella- und Clostridien-Hydrolysat). Zwischen den beiden viralen Inducern gab es deutliche Unterschiede. PIND AVI schützte überhaupt nicht und mit PIND ORF wurde ein Index von 60 erreicht.

Im *Pasteurella multocida*-Infektionsmodell erzielte erstmals ein viraler Inducer (PIND ORF) mit einem Wirkungsindex 100 das beste Ergebnis. Das Bordetella-Hydrolysat hatte einen Index von 71 und PIND AVI von 86. Der Wirkungsindex des Clostridien-Hydrolysats lag unter der Wirksamkeitsgrenze ($WI = 14$).

Von den verschiedenen Infektionsmodellen erwies sich das *Pseudomonas aeruginosa*-Modell in Bezug auf Anzüchtung der Keime, Einstellung der Belastungsdosis, Absterberate etc. als am besten reproduzierbar. Deshalb wurde dieses Modell für die Bestimmung der Wirkungseinheiten bei den verschiedenen Testsubstanzen ausgewählt. Die Dosis-Wirkungskurven sind in Abbildung 1 und die Wirkungseinheiten in Tabelle 5 zusammengefaßt.

In der Tabelle fällt auf, daß das Salmonella- und Bordetella-Hydrolysat mit Abstand die höchsten Wirkungseinheiten (WE) von ca. $1,3 \times 10^6$ /ml und $1,0 \times 10^6$ /ml erzielten. Bei unverdünnter Applikation blieben sie aber unwirksam. Das Clostridium propionicum-Hydrolysat hatte dagegen bei unverdünnter Anwendung die beste Wirkung, verlor aber dann relativ rasch an Wirksamkeit und besaß letztlich nur $1,0 \times 10^3$ Wirkungseinheiten pro ml. Der virale Inducer PIND AVI erreichte $1,0 \times 10^4$ WE/ml im *Pseudomonas*-Modell, wobei auch hier die größte Schutzwirkung bei unverdünnter Anwendung des Präparats erzielt wurde. PIND ORF zeigte mit 30 WE/ml die geringste infektionshemmende Wirkung.

Auf Grund dieser ersten Ergebnisse wählten wir für die weiteren Untersuchungen zur Entwicklung eines bakteriellen In-

ducers das *Bordetella bronchiseptica*-Hydrolysat aus. Dieses Hydrolysat schnitt im Durchschnitt am besten ab, und *Bordetella*-Keime hatten auch in Bezug auf die Herstellung der Keimsuspension die besten Eigenschaften (gutes Wachstum, geringes Infektionsrisiko etc.).

Am Beispiel von *Bordetella bronchiseptica* wurde zunächst die Frage geklärt, ob die bisher geprüfte alkalische Hydrolyse das beste Verfahren zur Herstellung bakterieller Inducer ist. In Tabelle 6 sind die Wirkungsindices verschiedener auf der Basis von *Bordetella bronchiseptica*-Keimen hergestellten Substanzen zusammengestellt. Im einzelnen verglichen wir die Schutzwirkungen (*Pseudomonas aeruginosa*-Modell) eines sauren und alkalischen Hydrolysats mit denen von formalininaktivierten oder autoklavierten Ganzbakterien, von mit Phenol-Wasser-extrahierten Keimen (Endotoxinfraktion), von durch einen wechselseitigen Einfrier- und Auftauvorgang lysierten Keimen oder von einer gemixten Keimsuspension. Die Ergebnisse bestätigen die guten paramunisierenden Eigenschaften des alkalisierten Hydrolysats. Es wurde in der Wirksamkeit von keiner anderen Präparation übertroffen. Aber auch die durch andere Verfahren hergestellten Präparate besaßen eine Schutzwirkung. Relativ schlecht schnitt nur das *Bordetella bronchiseptica*-Endotoxin ab (Phenol-Wasser extrahierte Keime).

Im nächsten Schritt wurde versucht die Wirksamkeit des Hydrolysats noch zu verbessern um zu klären, welche Anteile des Lysats für die Wirksamkeit verantwortlich sind. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse von unterschiedlich behandelten Hydrolysaten im *Pseudomonas*-Modell zusammengefaßt. Die Infektionsdosis wurde dabei so gewählt, daß im Vergleich zum unbehandelten Lysat Bewegungen in der Wirksamkeit nach oben oder unten erkennbar wurden.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß ein Erhitzen oder eine Gamma-Bestrahlung des Hydrolysats sich weder positiv noch negativ auf den Schutzeffekt auswirkt; der Wirkungsindex lag nach diesen Behandlungen unverändert bei 62,5. Die Zentrifugation des Lysats sollte darüber Aufschluß geben, ob die wirksamen Bestandteile des Lysats an Zellfragmente des Bakteriums oder an lösliche Substanzen gebunden sind. Der gute Schutzeffekt des Bodensatzes im Gegensatz zum Überstand beweist, daß die wirksame Substanz des Hydrolysats zum größten Teil durch schwerere Zellfraktionen repräsentiert wird.

Neben der Herstellungsart kann die paramunisierende Wirkung eines Präparats möglicherweise auch durch die Applikationstechnik beeinflußt werden. Im *Pseudomonas*-Modell wurde die Wirksamkeit des *Bordetella bronchiseptica*-Hydrolysats nach prophylaktischer intraperitonealer (bisherige Methode), subkutaner und intranasaler Anwendung geprüft. Wie aus Tabelle 8 ersichtlich wird, ist die intraperitoneale Applikation die mit Abstand günstigste Verabreichungsart. Nur die intraperitoneal mit dem Hydrolysat vorbehandelten Versuchstiere überlebten alle die tödliche Testinfektion (WI = 100). Eine schwache Wirksamkeit war dagegen bei subkutaner und intranasaler Anwendung festzustellen.

In den bisherigen Untersuchungen wurde das Hydrolysat immer prophylaktisch verabreicht. Für die Anwendung in der Praxis war interessant zu prüfen, ob die paramunisierende Wirkung auch bei anderen Applikationszeiten erhalten bleibt. Im einzelnen wurden die Versuchstiere 24, 48 und 72 Stunden vor der Infektion (*Pseudomonas*-Modell), gleichzeitig mit der Infektion und 5 Stunden nach der Infektion behandelt. Die Ergebnisse in Tabelle 9 zeigen, daß das

Bordetella bronchiseptica-Hydrolysat nur bei prophylaktischer, intraperitonealer Gabe wirksam war. Eine zufriedenstellende Schutzwirkung ergab sich dabei bis zu einer Verabreichung 48 Stunden vor der Testinfektion. Bei einer Applikation 72 Stunden vor der Infektion lag der Index nur noch knapp über der Signifikanzschwelle. Die gleichzeitig mit der Infektion oder 5 Stunden nach der Infektion vorgenommene Paramunisierung mit dem Hydrolysat blieb wirkungslos.

Tabelle 10 und Abbildung 2 geben einen Überblick über die Wirksamkeit des alkalischen Hydrolysats bei optimaler Anwendung (intraperitoneal, 24 Stunden vor der Testinfektion) gegen verschiedene bakterielle Infektionen. Beim Vergleich der Dosis-Wirkungskurven bzw. der Wirkungseinheiten wird deutlich, daß der Schutzeffekt des Lysats von Infektionsmodell zu Infektionsmodell variiert. Die beste Wirksamkeit, d.h. die höchsten Wirkungseinheiten (ca. 1×10^6 /ml) konnte im *Pseudomonas*-Modell festgestellt werden. Zehnmal schwächer war die Wirkung des Hydrolysats im *E. coli*-Modell und hundertmal schwächer im *Listeria*-Modell. Den schwächsten Schutzeffekt bot das Lysat im *Pasteurella*-Modell ($WE = 3,6 \times 10^3$ /ml) und ohne Wirkung blieb es gegen eine Rotlaufinfektion (*Erysipelothrix rhusiopathiae*). Bei der Bewertung der Wirksamkeit muß man berücksichtigen, daß die Infektionsdosen zwischen 5 und $10 LD_{50}$ variierten. Eine genaue Abstimmung der Dosen war aber aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich.

Tabelle 4: Paramunisierende Wirkung von verschiedenen bakteriellen Hydrolysaten sowie PIND AVI und PIND ORF bei bakteriellen Infektionen im Mäusemodell

Testsubstanz ²⁾	Wirkungsindex bei verschiedenen bakteriellen Infektionen			
	Pseudomonas (5 x LD ₅₀)	Listeria (10 x LD ₅₀)	Escherichia (5 x LD ₅₀)	Pasteurella (10 x LD ₅₀)
Bordetella bronchiseptica-Hydrolysat	100	83	86	71
Clostridium propionicum-Hydrolysat	100	100	80	14
Salmonella typhimurium-Hydrolysat	100	0	100	n.g. ¹⁾
Propionibacterium acnes-Hydrolysat	84	n.g.	n.g.	n.g.
PIND AVI	70	53	0	86
PIND ORF	30	n.g.	60	100
Kontrollgruppe (physiol. NaCl)	0	0	0	0

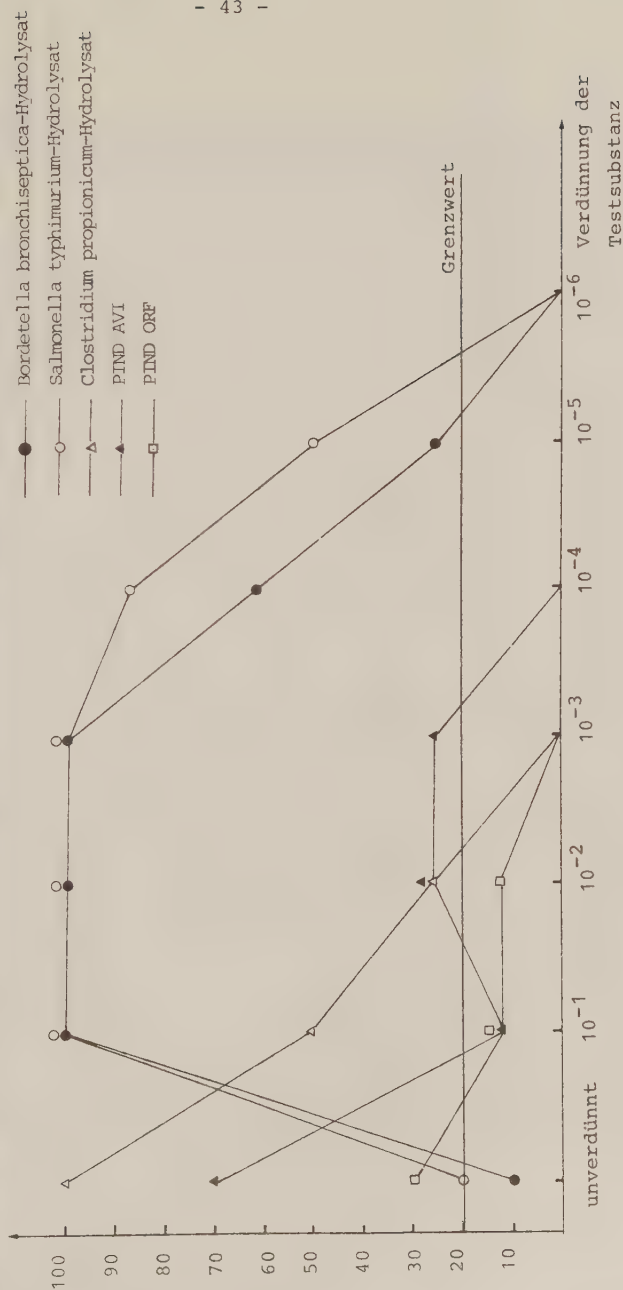
1) n.g. = nicht getestet

2) Applikation 24 Stunden vor der Testinfektion mit einer Dosis von 0,2 ml

Tabelle 5: Wirkungseinheiten verschiedener biologischer Paramunitätsinducer im Pseudomonas-Modell (vgl. Abb. 1)

Testsubstanz	Wirkungseinheiten (Pseudomonas-Modell)
Bordetella bronchiseptica-	$1,0 \times 10^6/\text{ml}$
Salmonella typhimurium-	$1,3 \times 10^6/\text{ml}$
Clostridium propionicum	$1,0 \times 10^3/\text{ml}$
PIND AVI	$1,0 \times 10^4/\text{ml}$
PIND ORF	$3,0 \times 10^1/\text{ml}$

Abbildung 1: Dosis-Wirkungskurven von bakteriellen Hydrolysaten und viralen Paramunitätsinducern¹⁾ im Pseudomonas aeruginosa-Infektionsmodell (vgl. Tab. 5)



¹⁾ intraperitoneale Applikation 24 Stunden vor der Testinfektion mit einer Dosis von 0,2 ml

Tabelle 6: Paramunisierende Eigenschaften von verschiedenen Bordetella bronchiseptica-Keimsuspensionen im Pseudomonas-Modell

Testsubstanzen ¹⁾ (0,2 ml i.p.)		Wirkungsindex bei verschiedenen Gebrauchsverdünnungen			
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Bordetella bronchiseptica- Keimsuspension	hydrolysiert -alkalisch-	100	100	62,5	25
	hydrolysiert -sauer-	100	12,5	0	n.g. ²⁾
	formalinaktiviert	100	100	n.g.	n.g.
	gemixt	100	100	50	0
	"Phenol-Wasser"-extrahiert	67	0	n.g.	n.g.
	"Frier-Tau"-extrahiert	100	100	25	0
	autoklaviert	100	58	n.g.	n.g.

¹⁾ Applikation 24 Stunden vor der Testinfektion

²⁾ n.g. = nicht getestet

Tabelle 7: Paramunisierende Eigenschaften von verschieden aufbereitetem Bordetella bronchiseptica-Hydrolysat im Pseudomonas-Modell

Testsubstanz ¹⁾ (0,2 ml i.p.)			Wirkungsindex
Bordetella-Hydrolysat (alkalisch)	unbehandelt		62,5
	autoklaviert		62,5
	gamma-bestrahlt		62,5
	zentri- fugiert	Bodensatz	80
		Überstand	38

1) Applikation 24 Stunden vor der Testinfektion

Tabelle 8: Paramunisierende Wirkung eines Bordetella bronchiseptica-Hydrolysats nach unterschiedlicher Applikation im Pseudomonas-Modell

Testsubstanz ¹⁾	Dosis	Applikationsart	Wirkungsindex
Bordetella bronchiseptica- Hydrolysat	1 x 0,2 ml	intraperitoneal	100
	1 x 0,5 ml	subkutan	30
	1 x 0,2 ml	intranasal	10

1) Applikation 24 Stunden vor der Testinfektion

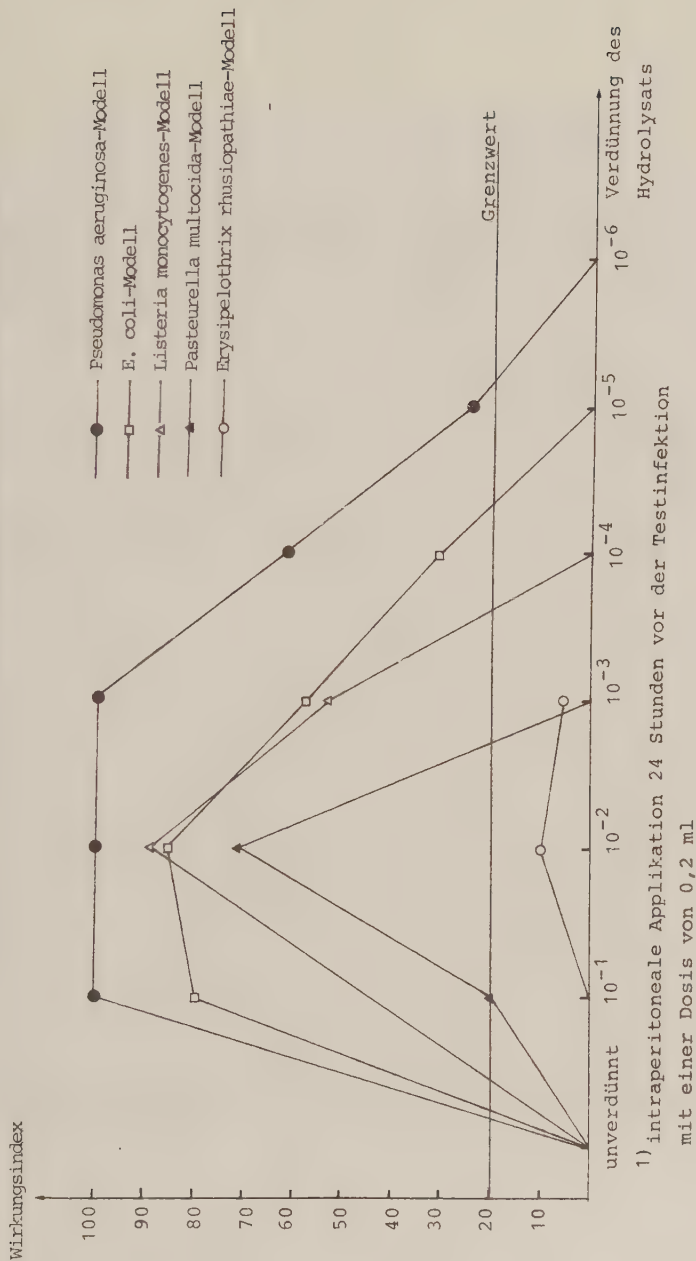
Tabelle 9: Einfluß des Zeitpunkts der Applikation auf die paramunisierende Wirkung eines Bordetella bronchiseptica-Hydrolysats im Pseudomonas-Modell

Testsubstanz	Applikationsart	Zeitpunkt der Applikation		Wirkungsindex
Bordetella bronchiseptica-Hydrolysats	intra-peritoneal (0,2 ml)	vor der	24 Std.	100
		Testin-	48 Std.	70
		fektion	72 Std.	20
		gleichzeitig m. d. Infektion		0
		nach der		
		Testin-	5 Std.	0
		fektion		

Tabelle 10: Wirkungseinheiten des Bordetella bronchiseptica-Hydrolysats in verschiedenen bakteriellen Infektionsmodellen (vgl. Abb. 2)

Testsubstanz	Infektionsmodell	Wirkungseinheiten
Bordetella bronchiseptica-Hydrolysats	Pseudomonas aeruginosa (5 x LD ₅₀)	1,0 x 10 ⁶ /ml
	Escherichia coli (5 x LD ₅₀)	2,0 x 10 ⁵ /ml
	Listeria monocytogenes (10 x LD ₅₀)	2,7 x 10 ⁴ /ml
	Pasteurella multocida (10 x LD ₅₀)	3,7 x 10 ³ /ml
	Erysipelothrix rhusiopathiae (10 x LD ₅₀)	0

Abbildung 2: Dosis-Wirkungskurven eines Bordetella-bronchiseptica Hydrolysats¹⁾ in verschiedenen bakteriellen Infektionsmodellen bei der Maus (vgl. Tab. 10)



D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Unsere Untersuchungen hatten zunächst zum Ziel, einfache und auch für routinemäßige Wirksamkeitsprüfungen von biologischen Paramunitätsinducern geeignete Infektionsmodelle bei der Maus zu entwickeln. Entsprechende virale Infektionsmodelle, wie das VSV- oder Aujeszky-Virus-Modell sind bereits bekannt (BRUNNER, 1983). Die bisher häufig verwendeten in vitro-Testsysteme zur Prüfung der paramunisierenden Eigenschaften einer Substanz (SCHRÖDER, 1981; SEDLACEK, 1984) sind zwar eine Ergänzung zu den Infektionsbelastungsversuchen, aber keine echte Alternative. Da sich die Schutzwirkung eines Inducers aus der Summe vieler Einzelwirkungen wie Interferoninduktion, Makrophagenaktivierung, Mediatorenfreisetzung etc. zusammensetzt, ist die Wirksamkeitsprüfung am lebenden Organismus, die alle bekannten und auch sicher noch unbekannten Abwehrfaktoren miteinschließt, nicht zu ersetzen. Es existiert bis heute kein einfaches in vitro-"screening"-System, das in breiten Rahmen angewendet werden könnte und mit dem die komplexen und nur zum Teil verstandenen in vivo-Reaktionen abgedeckt werden können.

Von den verschiedenen getesteten bakteriellen Infektionsmodellen war das *Pseudomonas aeruginosa*-Modell am besten geeignet, die Wirksamkeit biologischer Inducer bei der Maus zu überprüfen. *Pseudomonas aeruginosa*-Keime sind widerstandsfähig und relativ leicht zu züchten, und die Infektion läßt sich sehr gut reproduzieren. *Pseudomonas aeruginosa* hat sich bereits in früheren Untersuchungen als sicherer Testkeim zur Bestimmung der paramunisierenden Eigenschaften erwiesen. Im einzelnen handelte es sich dabei um die Modelle über die Steigerung der unspezifischen Abwehr in Bezug auf Wundinfektionen (HIMMER, 1977), die

Leber-Clearance im Perfusionstest (MEYER und MAYR, 1981) und die Organ-Clearance im Infektionsversuch (EISELE, 1977). Alle drei Prüfmethoden sind aber sehr arbeitsaufwendig und für laufende Routineuntersuchungen ungeeignet. Unsere Ergebnisse mit PIND AVI bei prophylaktischer Anwendung waren mit denen aus obigen Untersuchungen vergleichbar, womit die Aussagekraft unseres Infektionsmodells bestätigt wurde.

Neben der Ausarbeitung von Infektionsschutzmodellen sollten auch einfach herzustellende, wirksame Paramunitätsinducer auf bakterieller Basis entwickelt und geprüft werden. Von den verschiedenen, selbst hergestellten Substanzen hatte das Bakterien-Hydrolysat im Vergleich zu Ganzbakterienpräparationen die beste paramunisierende Wirkung gegenüber bakteriellen Infektionen. Die bekannten viralen Inducer PIND AVI und PIND ORF, die ihre infektionshemmende Potenz bei viralen Infektionen bereits unter Beweis stellten (BRUNNER, 1983), schnitten bei unseren Untersuchungen im Durchschnitt etwas schlechter ab als die Hydrolysate. Die Bakterienzelle mittels "chemischer" Lyse aufzuschließen, hat gegenüber der "mechanischen" Lyse den Vorteil, daß sie arbeitstechnisch einfacher zu handhaben und leichter standardisierbar ist. Neben der alkalischen und sauren Hydrolyse gibt es noch andere Aufschlußverfahren wie z.B. die Extraktionen mit Äther (YOUNGNER et al., 1974), Methanol-Azeton (GRISCELLI et al., 1982), Butanol (NITTA et al., 1978) oder Methanol (WEISS, 1976). Die "biologische" Lyse der Keime mit Hilfe von Bakteriophagen wurde ebenfalls mit Erfolg praktiziert (NOUGAYREDE, 1980; MIZIKOSHI et al., 1982).

Unter den von uns zur Hydrolyse verwendeten Bakterienstämmen war die paramunisierende Aktivität von *Bordetella bronchiseptica* sowohl in Bezug auf die Breitenwirkung gegen

die verschiedenen bakteriellen Infektionen als auch die Höhe der Wirkungsindices und Wirkungseinheiten herausragend. Dies überrascht nicht, da von *Bordetella pertussis* seit längerem immunmodulierende Eigenschaften bekannt sind (KIRCHNER et al., 1978). Die Gattung *Bordetella* scheint also allgemein dazu geeignet zu sein, das Abwehrsystem eines Organismus zu stimulieren. So wurde nach Applikation von *Bordetella pertussis*-Präparaten eine T-Lymphocyten- und Makrophagenaktivierung, eine Interferoninduktion und ein Schutzeffekt gegenüber viralen Infektionen beschrieben. Das Wirkprinzip von *Bordetella pertussis* ist in der Zellwand lokalisiert (KLEIN et al., 1982).

Obwohl das *Bordetella bronchiseptica*-Hydrolysat in den verschiedenen bakteriellen Infektionsmodellen Unterschiede in der Wirksamkeit erkennen ließ, war es nur im relativ "harten" Rotlaufmodell absolut unwirksam. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen. PETZOLDT (1982) prüfte das *Bacillus subtilis*-Kulturfiltrat BSK^R und den polyvalenten bakteriellen Lysatimpfstoff IRS-19^R im Rotlaufmodell und konnte ebenfalls keine bzw. eine äußerst geringe Steigerung der unspezifischen Abwehr gegen eine Rotlaufinfektion feststellen. Diese Ergebnisse und der Befund, daß die viralen Inducer in den bakteriellen Infektionsmodellen relativ ungünstig abschnitten, weisen darauf hin, daß sich die Wirksamkeit eines Paramunitäts-inducers durchaus auch nach dem zu erwartenden Infektionsspektrum richtet. Trotz der unspezifischen Stimulierung der Infektabwehr hat jeder einzelne Inducer mehr oder weniger eng umgrenzte Indikationsgebiete, d.h. es gibt Präparate, die bei verschiedenen Infektionen auch eine unterschiedliche infektionshemmende Potenz aufweisen. Eventuell liegt deshalb die Zukunft in der Entwicklung von Kombinationspräparaten, in denen mehrere Inducer mit verschiede-

nen Wirkungsspektren enthalten sind. Erfahrungen mit polyvalenten Inducern aus bakteriellen Komponenten sind bereits bekannt und haben zum Teil schon Eingang in die Humanpraxis gefunden (Broncho-Vaxom^R). Die Zusammenstellung möglichst vieler bakterieller Substanzen ohne fundierte experimentelle Studien garantiert aber nicht eine dement-sprechende Potenzierung der immunstimulierenden Aktivität, da die Wirksamkeit dieser Präparate oft nur mit einer einzelnen bzw. wenigen Komponenten korreliert (NOUGAYREDE, 1980). Die Bekämpfung von viralen und gleichzeitig bakteriellen Sekundärinfektionen verlangt wahrscheinlich die Entwicklung von kombinierten biologischen Inducern auf der Basis von bakteriellem und viralem Material.

Die im Infektionsmodell von uns geprüften Lysate aus gram-negativen Bakterien (*Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*) erzielten fast durchwegs höhere Wirkungseinheiten als die aus grampositiven Bakterien (*Clostridium propionicum*, *Propionibacterium acnes*). Bei der Immunmodulation mit gramnegativen Bakterien sind jedoch toxische Nebenwirkungen nicht auszuschließen, die zum größten Teil auf die endotoxische Aktivität der Lipid A-Fraktion des LPS zurückzuführen sind (VOGEL et al., 1984; LÜDERITZ et al., 1984). Auch in unseren Versuchen war die konzentrierte Anwendung der *Bordetella*- und *Salmonella*-Hydrolysate toxisch, was sich anhand der erhöhten Absterberate der behandelten Versuchstiere gegenüber der Kontrollgruppe zeigte. Bei entsprechender Verdünnung lieferten die Hydrolysate aber nicht nur hohe Schutzwerte in den Infektionsmodellen, sondern führten auch zu keinen unerwünschten Nebenwirkungen innerhalb des 10tägigen Beobachtungszeitraums. Die endgültige Entscheidung über die Unschädlichkeit der Bakterienhydrolysate muß jetzt der Feldversuch bei Nutz- und Haustieren bringen. Die Ergebnisse bei der

Maus deuten darauf hin, daß mit dem Hydrolysat, vor allem von *Bordetella bronchiseptica*, ein Präparat mit guter Verträglichkeit und guten paramunisierenden Eigenschaften zur Verfügung steht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit bakteriellen Hydrolysaten die unspezifische Abwehr gegen bakterielle Infektionen gestärkt werden kann. Bakterielle Inducer haben gegenüber viralen Inducern den Vorteil, daß sie einerseits sehr viel einfacher und schneller und somit auch billiger herstellbar sind, und andererseits gegenüber bakteriellen Infektionen wesentlich wirksamer sind.

E ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden fünf verschiedene bakterielle Infektionsmodelle bei der Maus ausgearbeitet. Das *Pseudomonas aeruginosa*-Modell war dabei am besten geeignet, die Wirksamkeit biologischer Paramunitäts-inducer zu überprüfen.

Von den auf der Basis von Bakterien hergestellten Hydrolysaten (*Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium propionicum*, *Propionibacterium acnes*) hatte das *Bordetella bronchiseptica*-Hydrolysat die besten paramunisierenden Eigenschaften: Es erhöhte die unspezifische Abwehr gegenüber Testinfektionen mit *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida* und *Listeria monocytogenes*.

Die zum Vergleich mituntersuchten bekannten viralen Paramunitätsinducer PIND AVI und PIND ORF konnten zwar ebenfalls die unspezifische Abwehr gegen bakterielle Infektionen steigern, erreichten aber insgesamt nicht die hohen Wirkungsindices der bakteriellen Hydrolysate.

Eine Weiterbehandlung der Hydrolysate durch γ -Bestrahlung oder Erhitzen erhöhte die paramunisierenden Eigenschaften nicht. Die wirksame Substanz der Lysate war an größere Zellfragmente gebunden.

Neben der Herstellungsart wurde die Wirksamkeit der getesteten Präparate auch durch die Applikationstechnik beeinflusst, wobei die prophylaktische intraperitoneale Vorbehandlung der Versuchstiere 24 Stunden vor der Testinfektion die optimale Verabreichungsart darstellt. Ein befriedigendes Ergebnis konnte auch nach subkutaner Applikation erzielt werden.

SUMMARY

Experimental Investigations on the Paramunizing Properties of Bacterial Lysates Against Bacterial Infections in Mice

Five different bacterial infection models were elaborated in mice. The *Pseudomonas aeruginosa*-model proved best to be for routine tests with biological paramunity inducers.

Hydrolysates from *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium propionicum*, *Propionibacterium acnes* and the viral inducers PIND AVI and PIND ORF were investigated for their paramunizing properties in bacterial infection models. *Bordetella bronchiseptica* had the highest efficacy: it increased nonspecific defence rates against challenge with *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida* and *Listeria monocytogenes*. PIND AVI and PIND ORF, which were used for comparison, also enhanced nonspecific defense against bacterial infections, but their overall efficacy was lower than that of bacterial lysates.

γ -irradiation or heating did not destroy the stimulatory ability of bacterial lysates. The paramunizing properties of the lysates were bound to the larger cell fragments.

In addition to the method of preparation the efficacy of the lysates could also be influenced by the technique of application used. The highest protection rate was observed in mice after intraperitoneal paramunization 24 hours before challenge infection. A satisfactory result could be obtained after subcutaneous application too.

F LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM, A., R. CIORBARU, J.-F., PETIT, E. LEDERER, 1972: Isolation and properties of a macromolecular water-soluble immunoadjuvant fraction from the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 851
- AHRENS, J., M. WIEDENBACH, 1984: Die Wirksamkeit des Immunstimulators Broncho-Vaxom.
Schweiz. Med. Wschr. 114, 932
- BAKER, L.A., P.A. CAMBELL, J.R. HOLLISTER, 1977: Chemotaxis and complement fixation by *Listeria monocytogenes* cell wall fractions.
J. Immunol. 119, 1723
- BALDWIN, R.W., U.S. BYERS, 1979: Immunoregulation by bacterial organism and their role in immunotherapy of cancer.
Springer Semin. Immunopath. 2, 79
- BALDWIN, R.W., M.V. PIMM, 1978: BCG in tumor immunotherapy.
Adv. Cancer Rec. 28, 91
- BANCK, G., A. FORSGREN, 1978: Many bacterial species are mitogenic for human blood B lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 8, 347
- BANY, J., J. KAZNIERCZUK, S. SZMIGIELSKI, J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1984: Immunomodulation by *Propionibacterium granulosum* KP 45 and experimental Trichinellosis in mice.
Zbl. Bakt. Hyg. A 256, 518
- BARTLETT, G.L., J.W. KREIDER, D.M. PURNELL, 1980: Treatment of cancer using *Corynebacterium parvum*: similarity of two preparations in four animal tumor models.
Cancer 46, 685
- BAST, R.C., B.S. BAST, H.J. RAPP, 1976: Critical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with nonspecific immunostimulants.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 277, 60

- BAY, P.K., S.K. BANDYOPADHYAY, 1983: Inhibition of rat mammary tumor growth by purified Protein A - a potential antitumor agent.
Immunological Communications 12, 453
- BECK, J., H. BRUNNER, F. MARCUCCI, H. KIRCHNER, J. WIETZ-ERBIN, 1982: Induction of interferon by Mycoplasmas in mouse spleen cell culture.
J. Interferon Res. 2, 31
- BEKIERKUNST, A., I.S. LEVIJ, E. YARKONI, E. VILKAS, A. ADAM, E. LEDERER, 1969: Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions.
J. Bact. 100, 95
- BIBERFELD, G., E. GRONOWICZ, 1976: Mycoplasma pneumoniae is a polyclonal B-cell activator.
Nature 261, 238
- BILLIAU, A.F., L. Schonne, L. EYCKMANS, P. DE SOMER, 1970: Interferon induction and resistance to virus infection in mice infected with Brucella abortus.
Infect. Immun. 2, 698
- BLOKSMA, N., E. DE HEER, H. VAN DIJK, J.M. WILLERS, 1979: Adjuvanticity of Lactobacilli I. Differential effects of viable and killed bacteria.
Clin. Exp. Immunol. 37, 367
- BLOKSMA, N. H. ETTEKOVEN, F.M. HOFHUIS, L. VAN NOORLE-JANSEN, M.J. DE REUVER, J.G. KREEFTENBERG, J.M. WILLERS, 1981: Effects of Lactobacilli on parameters of non-specific resistance of mice.
Med. Microbiol. Immunol. 170, 45
- BONA, C. 1979: Modulation of immune response by Nocardia immunostimulants
Prog. Allergy 26, 97

- BORECKY, L., V. LACKOVIC, 1967: The cellular background of interferon production in vivo. Comparison of interferon induction by Newcastle Disease virus and Bordetella pertussis.
Acta Virologica 11, 150
- BRENER, Z., J.E. CARDOSO, 1976: Nonspecific resistance against Trypanosoma cruzi enhanced by Corynebacterium parvum.
J. Parasitol. 62, 645
- BRUNNER, R., 1983: Neue Versuchstiermodelle zum Nachweis einer medikamentellen Stimulierung der unspezifischen, körpereigenen Abwehr.
Vortrag zum XXII Welttierärztekongreß in Perth, 1983
- BUCK, G.E., M.T. KELLY, 1980: Investigation of the component of Propionibacterium acnes responsible for macrophage activation.
Infect. Immun. 27, 620
- BUDZKO, Z., J. CASALS, B.H. WAKSMAN, 1978: Enhanced resistance against Junin virus infection induced by Corynebacterium parvum.
Infect. Immun. 19, 893
- CAMBELL, P.A., J.E. CALDWELL, A.L. HARTMAN, 1979: Use of a macrophage cytotoxicity system to show macrophage activation by Listeria monocytogenes cell wall fraction.
Scand. J. Immunol. 10, 1
- CAMBELL, P.A., G.E. RODRIGUEZ, C. SCHUFFLER, 1975: Listeria cell wall fraction: adjuvant activity in vivo and in vitro.
Cell Immunol. 17, 418
- CATALONA, W.J., T.L. RUTLIFF, R.E. MC COOL, 1981: γ Interferon induced by Staphylococcus aureus protein A augments natural killing and ADCC.
Nature 291, 77

- CAVALLI-SFORZA, 1969: Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik, Stuttgart 1969
- CHEDID, L., 1983: Muramyl Peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators.
Microbiol. Immunol. 27, 723
- CHEDID, L., F. AUDIBERT, 1984: Bacterial products with immunomodulator activity and new vaccines.
EOS-Journal of Immunology and Immunopharmacology Vol. IV, 74
- CHEDID, L. M.A. PARANT, F.M. AUDIBERT, G.J. RIVEAU, F.J. PARANT, E. LEDERER, J.P. CHOAY, P.L. LEFRANCIER, 1982 a: Biological activity of a new synthetic muramyl peptide adjuvant devoid of pyrogenicity.
Infect. Immun. 35, 417
- CHEDID, L., A. MORIN, N. PHILLIPS, 1982 b: Potential use of muramyl peptides in cancer therapy and prevention.
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G. Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London, 1982, 49
- CHEN, Y.U., R.E.W. HANCOCK, R.I. MISHELL, 1980: Mitogenic effects of purified outer membrane proteins from *Pseudomonas aeruginosa*.
Infect. Immun. 28, 178
- CLARK, I. A., 1979: Protection of mice against *Babesia microti* with cord factor, COAM, Zymosan, glucan, *Salmonella* and *Listeria*.
Parasite Immunology 1, 179
- CLARK, I.A., A.C. ALLISON, F.E. COX, 1976: Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG.
Nature 259, 309
- CLARK, I.A., F.E.G. COX, A.C. ALLISON, 1977: Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with killed *Corynebacterium parvum*.
Parasitology 74, 9

- CLUFF, L.E., 1970: Effects of endotoxins on susceptibility to infections.
J. Infect. Dis. 122, 205
- COHEN, J.J., G.E. RODRIGUEZ, P.D. KIND, P.A. CAMBELL, 1975: Listeria cell wall fraction: a B cell mitogen.
J. Immunol. 114, 1132
- COLE, B.C., G.J. SULLIVAN, R.A. DAYNES, L.A. SAYED, J.R. WARD, 1982: Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from Mycoplasma arthritidis II. Cellular requirements for T cell transformation mediated by a soluble mycoplasma mitogen.
J. Immunol. 128, 2013.
- COLE, B.C., 1983: H₂-gene control and biological activities of a T-cell mitogen derived from Mycoplasma arthritidis: a review.
Yale J. Biol. Med. 56, 605
- COLE, B.C., R.N. THORPE, 1983: Induction of human γ -interferon by a mitogen derived from Mycoplasma arthritidis and by Phytohemagglutinin: differential inhibition with monoclonal anti-HLA-DR antibodies.
J. Immunol. 131, 2392
- COLLINS, F.M., M.T. SCOTT, 1974: Effect of Corynebacterium parvum treatment on the growth of Salmonella enteritidis in mice.
Infect. Immun. 9, 863
- DINARELLO, C.A., R.J. ELIN, L. CHEDID, S.M. WOLFF, 1978: The pyrogenicity of the synthetic muramyl dipeptide and two structural analogues.
J. Infect. Dis. 138, 760
- EICHELBERG, D., W., SCHMUTZLER, 1983: Pharmakologische Aspekte der Immunstimulation.
Immun. Infekt. 11, 109

- EISELE, K.A., 1977: Untersuchungen über die Phagozytose-tätigkeit keimfreier Ratten gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* und Erarbeitung eines Testverfahrens für die Kontrolle von praemunisierenden Substanzen bezüglich Steigerung der Phagozytoserate in der keimfreien Ratte.
Vet. Med. Diss., München, 1976
- ENDOH, M., T. FUJIMOTO, Y. NAKASE, 1983: Pleurorrhea-inducing activity of the histamin-sensitizing factor of *Bordetella pertussis*.
Microbiol. Immunol. 27, 979
- FORSQREN, A., A. SVEDJELUND, H. WIGZELL, 1976: Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*.
Eur. J. Immunol. 6, 207
- FREEMAN, V.H., T.A. CALVELLI, S. SILAGI, S.C. SILVERSTEIN, 1980: Macrophages elicited with heat-killed *Bacillus Calmette-Guerin* protect C5BL/6J mice against a syngeneic melanoma.
J. Exp. Med. 152, 657
- FRIEDMAN, H., T. KLEIN, R.C. BUTLER, 1984: Bacterial antigens as immunomodulators.
In: Immunomodulation, new frontiers and advances, eds.: H.H. Fudenberg, H.D. Whitten, F. Ambrogi, Plenum Press, New York, 1984, 209
- FUKUSHI, K., H. ASANO, J. SASAKI, 1982: Antitumor activity of deacylated *Salmonella* endotoxin combined with trehalose dimycolate.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 395
- GABRIELSON, D.A., J.F. KELLEHER, J. VARANI, 1980: Effect of *Corynebacterium granulosum* immunopotential on the pathogenesis of herpes simplex virus type 2 in BALB/c mice
Infect. Immun. 30, 791

- GALANOS, C., 1975: Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component.
Z. Immun. Forsch. 149, 214
- GANGEMI, J.D., J.H. HIGHTOWER, R.A. JACKSON, M.H. MAHER, M.G. WELSH, M.M. SIGEL, 1983: Enhancement of natural resistance to Influenza virus in lipopolysaccharide-responsive and -nonresponsive mice by Propionibacterium acnes.
Infect. Immun. 39, 726
- GATENBY, P., A. BASTEN, 1980: A mouse model for immunotherapy of osteosarcoma II. Corynebacterium parvum therapy.
Cancer Immunol. Immunother. 8, 103
- GIL, J., A. BADOWSKI, T. ORLOWSKI, Z. DUMANSKI, M. JANIĄK, S. STUGIELSKI, J. JELJASZCZYK, G. PULVERER, 1982: Lokale Immunmodulation bei fortgeschrittenem Morbus Crohn mit einem Zellwandpräparat von Propionibacterium granulosum KP-45.
Leber Mag. D 12, 230
- GIRARD, J.P., S. FLEURY, 1979: Vergleichende Untersuchung der Lymphocytenreaktion in vitro auf Levamisol und ein Bakterienlysat.
Méd et Hyg. 37, 2519
- GLASGOW, L.A., J. FISCHBACH, S.M. BRYANT, E.R. KERN, 1977: Immunomodulation of host resistance to experimental viral infections in mice: effects of Corynebacterium parvum and BCG
J. Infect. Dis. 135, 763
- GLASGOW, L.A., J.L. CRANE, C.J. SCHLEUPNER, E.R. KERN, J. S. YOUNGNER, D.S. FEINGOLD, 1978: Activation of reticuloendothelial system macrophages and enhancement of host resistance to transplantable osteogenic sarcoma in mice by an extract of Brucella abortus.
Cancer Treat. Rep. 62, 1931

- GLASGOW, L.A., J.L. CRANE, C.J. SCHLEUPNER, E.R. KERN, J. S. YOUNGNER, D.S. FEINGOLD, 1979: Enhancement of resistance to murine osteogenic carcinoma in vivo by an extract of *Brucella abortus* (Bru-Pel): association with activation of reticuloendothelial system macrophages.
Infect. Immun. 23, 19
- GRISCELLI, C., B. GROSPIERRE, J. MONTREUIL, B. FOURNET, G. BRUVIER, J.M. LANG, C. MARCHIANI, R. ZALISCZ, R. EDELSTEIN, 1982: Immunomodulation by glycoprotein fraction isolated from *Klebsiella pneumoniae*.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 261
- HADDEN, J.W., L. DELMONTE, H.F. OETTGEN, 1977: Mechanism of Immunopotentialiation.
In: Comprehensive Immunology 3, Immunopharmacology, ser.-eds.: R.A. Good, S.B. Day, Plenum Medical Book Company, New York, 1977, 279
- HALPERN, B., A.R. PREVOT, G. BIOZZI, C. STIFFEL, D. MOUTON, J.C. MORARD, Y. BOUTHILIER, C. DE CREUSEFOND, 1964: Stimulation de l'activité phagocytaire du système reticuloendothelial provoqué par *Corynebacterium parvum*.
J. Reticuloendothel Soc. 1, 77
- HALPERN, B., 1975: *Corynebacterium parvum*.
In: Application in experimental and clinical oncology, ed.: B. Halpern, Plenum Press, New York, 1975, 181
- HERSH, E.M., J. QUESADA, S.G. MURPHY, J.U. GUTTERMANN, R. D. HUTCHINS, 1982: Evaluation of therapy with methanol extraction residue of BCG (MER).
Cancer Immunol. Immunother. 14, 4
- HIBBS, J.B., J.S. REMINGTON, C.C. STEWART, 1980: Modulation of immunity and host resistance by microorganism.
Pharmacol. Ther. 8, 3769

- HIMMER, B., 1977: Prophylaxe bzw. Therapie bei *Pseudomonas aeruginosa* Wundinfektionen durch Steigerung der nicht-erregerspezifischen Abwehr.
Vet. Med. Diss. München, 1977
- HIRT, H.M., H. BECKER, H. KIRCHNER, 1978: Induction of interferon production in mouse spleen cell cultures by *Corynebacterium parvum*.
Cell. Immunol. 38, 168
- HO, M.K., A.S. KONG, S.I. MORSE, 1980: The in vitro effect of *Bordetella pertussis* lymphocytosis promoting factor on murine lymphocytes V. Modulation of T-cell proliferation by helper and suppressor lymphocytes.
J. Immunol. 124, 362
- HOWARD, J.G., M.T. SCOTT, G.H. CHRISTIE, 1973: Cellular mechanism underlying the adjuvant activity of *Corynebacterium parvum*: interactions of activated macrophages with T und B lymphocytes.
In: Immunopotential, Ciba Foundation Symposium 18, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, 101
- ISHII, Y., H. YAMAOKA, T. KENTARO, K. KIKUCHI, 1976: Inhibition of tumor growth in vivo by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation OK-432.
Gann 67, 115
- JAMES, K., A. GHAFAR, I. MILNE, 1974: The effect of transplanted methylocholantrene induced fibrosarcoma and *Corynebacterium parvum* on the immune response of CBA and A/HeJ mice to thymus dependent and independent antigens.
Br. J. Cancer 29, 11
- JONES, C.M., D. TARAMELLI, C.A. CLOUSE, R.G. GOLDFARB, 1984: Role of bacterial lipopolysaccharide and lymphokine in the regulation of macrophage activation: correlation between secretion of plasminogen activator and tumor lysis.
Immunobiol. 166, 410

- JUNGI, W., 1976: BCG in der Krebstherapie - Wunschtraum oder Therapie der Zukunft.
Schweiz. Med. Wschr. 106, 1389
- KAI, S., J. TANAKA, K. NOMOTO, H. TORISU, 1979: Studies on the immunopotentiating effects of a streptococcal preparation OK-432. I. Enhancement of T-cell-mediated immune responses of mice.
Clin. Exp. Immunol. 37, 98
- KAMISANGO, K., I. SAIKI, Y. TANIO, H. OKUMURA, I. AZUMA, Y. YAMAMURA, 1982: The adjuvant and antitumor activities of *Listeria monocytogenes* cell wall skeleton and peptidoglycan.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 387
- KATO, I., S. KOBAYASHI, T. YOKOKURA, M. MUTAI, 1981: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice.
Gann 72, 517
- KATO, I., T. YOKOKURA, M. MUTAI, 1983 a: Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice.
Microbiol. Immunol. 27, 611
- KATO, N., I. NAKASHIMA, M. OHTA, 1975: Interferon production in mice by the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*.
Infect. Immun. 12, 1
- KATO, N., N. KIDO, M. OHTA, S. NAITO, T. HASEGAWA, M. MORI, N. AGATA, I. NAKASHIMA, T. KUNO, 1983 b: Adjuvant activity of *Klebsiella* 03 lipopolysaccharide: no contribution of proteins to the expression of adjuvant activity.
Microbiol. Immunol. 27, 1043
- KEARNS, R.J., R.W. LEU, 1984: Modulation of natural killer activity in mice following infection with *Listeria monocytogenes*.
Cell. Immunol. 84, 361

- KELLER, R., 1984: Multizentrische Doppeltblindstudie über die Wirkung von Broncho-Vaxom bei chronischer Bronchitis.
Schweiz. Med. Wschr. 114, 934
- KERN, E.R., L.A. GLASGOW, J.C. OVERALL, 1976: Antiviral activity of an extract of *Brucella abortus*: induction of interferon and immunopotential of host resistance.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 152, 372
- KIDO, N., I. NAKASHIMA, N. KATO, 1984: Correlation between strong adjuvant activity of *Klebsiella* 03 lipopolysaccharide and its ability to induce interleukin 1 secretion.
Cell. Immunol. 85, 477
- KIRCHNER, H., H. BRUNNER, H. RUHL, 1977: Effect of *Acholeplasma laidlawii* on murine and human lymphocyte cultures.
Clin. Exp. Immunol. 29, 176
- KIRCHNER, H., M.T. SCOTT, H.M. HIRT, K. MUNK, 1978: Protection of mice against viral infection by *Corynebacterium parvum* and *Bordetella pertussis*.
J. Gen. Virol. 41, 97
- KIRCHNER, H. E. STORCH, L. SCHINDLER, 1982: *Corynebacterium parvum*: antiviral protection, interferon induction and activation of natural killer cells.
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G. Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London, 1982, 220
- KLEIN, T.W., W.R. BENJAMIN, C.J. GUZZALDO, H. FRIEDMAN, 1982: Enhancement of macrophage lysosomal enzyme activity by *Bordetella pertussis* endotoxin.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Katan, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 295

- KLIMPEL, G.R., C.S. HENNEY, 1978: BCG-induced suppressor cells. I. Demonstration of macrophage-like suppressor cell that inhibits cytotoxic T-cell generation in vitro.
J. Immunol. 120, 563
- KO, H.L., W. ROSZKOWSKI, J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1981: Comparativ study on the immunostimulatory potency of different Propionibacteria.
Med. Microbiol. Immunol. 170, 1
- KOBAYASHI, F., T. NAGOYA, T. KOSHI, Y. SAINO, 1980: Biphasic protection against bacterial infection in mice induced by vaccination of Propionibacterium acnes.
Infect. Immun. 27, 391
- KODOMA, M., T. MIZUKURO, N. YAMAGUCHI, S. YOSHIDA, Y. KATAYAMA, 1982: The mechanism of antitumor activity of the bacterial endotoxin.
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G. Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London, 1982, 167
- KONDO, M., H. KATO, T. YOSHIKAWA, M. KATANO, M. TORUSI, 1982: Clinical evaluation of anticancer activity of a streptococcal preparation OK-432 (Picibanil).
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G. Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London, 1982, 415
- KOTANI, S., H. TAKADA, M. TSUJIMOTO, T. KUTO, T. OGAWA, I. AZUMA, H. OGAWA, K. MATSUMOTO, W.A. SIDDIQUI, A. TANAKA, S. NAGAO, O. KOHASHI, S. KANO, T. SHIPA, S. KUSUMOTO, 1982: Nonspecific and antigen-specific stimulation of host defence mechanism by lipophilic derivates of muramyl dipeptide.
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G. Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London, 1982, 67

- KOTANI, S. T. HARUHIKO, M. TSUJIMOTO, T. OGAWA, Y. MORI, M. SAKUTA, A. KAWASAKI, M. INAGE, S. KUSUMOTO, T. SHIBA, N. KASAI, 1983: Immunobiological activities of synthetic lipid A analogs and related compounds as compared with those of bacterial lipopolysaccharide, re-glycolipid, lipid A and muramyl dipeptide. *Infect. Immun.* 41, 758
- KREEFTENBERG, J.G., W.H. DE JONG, H. ETTEKOVEN, P.A. STEERENBERG, W. KRUIZINGA, L.M. VAN NOORLE JANSEN, J. SEKHUIS, E.J. RUITENBERG, 1981: Experimental screening of two BCG preparations produced according to different principles. *Cancer Immunol. Immunother.* 12, 21
- KUMAZAWA, Y., A. YAMADA, C. NISHIMURA, K. MIZUNOE. 1982: Modulation of antibody responses of mice by lymphocytosis-promoting factor from *Bordetella pertussis*. In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 270
- LAMBRIS, J., M. PAPAMICHAIL, C. IOANNIDIS, G. DIMITRACOPOULOS, 1982: Activation of the alternative pathway of human complement by the extracellular slime glycoprotein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 145, 78
- LANG, H.-P., 1983: Feldversuch mit dem Paramunitätsinducer "BSK". *Tierärztl. Umschau* 38, 742
- LANGFORD, M.P., J.A. GEORGIADES, G.H. STANTON, F. DIANZANI, H.M. JOHNSON, 1979: Large-scale production and physicochemical characterization of human immune interferon. *Infect. Immun.* 26, 36
- LEARN, D.B., J.S. SNYDER, 1983: Effect of *Micropolyspora faeni* cells and cell wall fractions on rabbit alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 39, 968

- LEDERER, E., 1980: Synthetic immunostimulants derives from the bacterial cell wall.
J. Med. Chem. 23, 819
- LEDERER, E., 1982: Recent progress in the study of natural and synthetic immunomodulators derived from bacterial cell walls.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 3
- LICHTENSTEIN, A., J. MURAHATA, J. ZIGHELBOIM, 1980: Inhibition of cell-mediated cytotoxicity by *Corynebacterium parvum*. Influence of dose and route of administration.
Cancer Immunol. Immunother. 8, 39
- LICHTENSTEIN, A., R. MURAHATA, R. SUGASAWARA, J. ZIGHELBOIM, 1981: Suppressor T-cells and suppressor macrophages induced by *Corynebacterium parvum*.
Cell. Immunol. 58, 257
- LODMELL, D.C., L.C. EWALT, 1978: Induction of enhanced resistance against Encephalomyocarditis virus infection of mice by nonviable *Mycobacterium tuberculosis*: mechanism of protection.
Infect. Immun. 22, 740
- LOSA, G.A., G.J.M. MAESTRONI, 1984: Klinische und immunbiologische Wirkung eines oral verabreichten Bakterienextraktes.
Schweiz. Med. Wschr. 114, 930
- LÜDERITZ, O., K. TANAMOTO, C. GALANOS, G.R. MC KENZIE, H. BRADE, U. ZÄHRINGER, E.T. RIETSCHER, S. KUSUMOTO, T. SHIBA, 1984: Lipopolysaccharides: structural principles and biologic activities.
Rev. Infect. Dis. 6, 428

- MARX, J.H., C. MOTSZKO, R.C. ROBERTS, 1980: Antibody independent complement consumption by *Micropolyspora faeni*.
Int. Arch. Allergy App. Immunol. 62, 133
- MATHE, G., I. FLORENTIN, M. BRULEY-ROSSET, M. HAYAT, C. BOURUT, 1977: Heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* as a systemic adjuvant in cancer immunotherapy.
Biomedicine 27, 368
- MATHE, G., 1980: Experience gained in immunotherapy from the immunopharmacology of BCG leading to a second generation of systemic immunity adjuvants.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 3, 407
- MATHEWS, H.L., 1981: Antitumor effects of a variety of nonviable bacteria against the murine EL-4 lymphoma.
Cancer Immunol. Immunother. 12, 81
- MATSUBARA, S., F. SUZUKI, N. ISHIBA, 1979: Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK-432.
Cancer Immunol. Immunother. 6, 41
- MAYR, A., H.J. SENN, W.M. GALLMEIER, U. BRUNTSCH, R. DRINGS, D. FRITZE, H. KAUFMANN, W. QUEISSER, U. KEMPGENS, 1979: Adriamycin-Kombinations-Chemotherapie mit oder ohne Immunstimulation durch *Corynebakterium parvum* beim metastasierenden Mammakarzinom. Ergebnisse einer prospektiven, randomisierten, multizentrischen Studie.
Dtsch. Med. Wochenschr. 104, 1739
- MAYR, A., G. EISSNER, B. MAYR-BIBRACK, 1984: Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.
Paul Parey Verlag, Berlin 1984, 82
- MC BRIDE, E.H., D.M. WEIR, A.B. KAY, J.R. CALDWELL, D. PEARCE, 1975: Activation of the classical and alternative pathways of complement by *Corynebacterium parvum*.
Clin. Exp. Immunol. 19, 143

- MC FARLAN, R.I., R. CEREDIG, D.O. WHITE, 1979: Comparison of natural killer cells induced by Kunjin virus and *Corynebacterium parvum* with those occurring naturally in nude mice.
Infect. Immun. 26, 832
- MEYER, H., A. MAYR, 1981: Untersuchungen über die Clearance und Phagozytose gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* an isoliert perfundierten Lebern von keimfreien Ratten nach Vorbehandlung mit dem Paramunitätsinducer "PIND-AVI".
Zbl. Vet. Med. B 28, 45
- MIZUKOSHI, M., H. MIYAKOSHI, Y., HORIKAWA, T. AOKI, 1982: Staphage lysate (SPL) as a mitogen and an immunomodulator.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 323
- MOORE, R.N., P.S. STEEG, D.N. MÄNNEL, S.E. MERGENHAGEN, 1980: Role of lipopolysaccharide in regulation colonystimulating factor-dependent macrophage proliferation in vitro.
Infect. Immun. 30, 797
- MORIYASU, F., H. MIWA, K. ORITA, 1982: Immunochemotherapy of gastric cancer patients with OK-432.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 442
- MURAYAMA, T. S. NATSUUME-SAKAI, S. RYAYAMA, S. KOSHIMURA, 1982: Studies of the properties of a streptococcal preparation, OK-432 (NSC-B116209), as an immunopotentiator.
Cancer Immunol. Immunother. 12, 141

- MÜLLER, E., B. SONNENSCHNIG, 1985: Die Beeinflussung der nicht-erregerspezifischen Abwehr durch Bakterien, Pilze und ihre Stoffwechselprodukte. Tierärztl. Praxis 13, im Druck
- NAKANE, A., T. MINAGAWA, 1981: Alternativ induction of IFN- α and IFN- γ by *Listeria monocytogenes* in human periphall blood mononuclear leucocyte cultures. J. Immunol. 126, 2139
- NAKANO, N., T. SAITO-TAKI, H. KONNO, T. NITTA, S. OKUMURA, 1982: Butanol-extracted water-soluble adjuvant (Bu-WSA)-induced non-specific resistance to infection. In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 335
- NAKASHIMA, I., F. NAGASE, T. YOKOCHI, M. OHTA, Y. FUJII, N. KATO, 1982: The mechanism of action of the *Klebsiella* adjuvant polysaccharide. In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 257
- NAOT, Y., S. MERCHAV, H. GINSBURG, 1979 a: *Mycoplasma neurolyticum*: a potent mitogen for rat B-lymphocytes. Eur. J. Immunol. 9, 185
- NAOT, Y., S. MERCHAV, E. BEN-DAVID, H. GINSBURG, 1979 b: Mitogenic activity of *Mycoplasma pulmonalis*. I. Stimulation of rat B and T lymphocytes. Immunology 36, 399
- NITTA, T., S. OKUMURA, M.J. TANABE, M. NAKANO, 1978: Watersoluble adjuvant obtained from *Bacterionema matruchotii*. Infect. Immun. 20, 721
- NITTA, T., S. OKUMURA, M. NAKANO, 1980: Mitogenic activity of water-soluble adjuvant obtained from *Bacterionema matruchotii*. Infect. Immun. 28, 28

- NOUGAYREDE, A., 1980: Immunostimulation. Etude de quelques lysats bacteriens.
These pour le Doctorat Veterinaire, Ecole National Veterinaire d'Alfort, Paris 1980
- NOWOTNY, A., A. ABELMOOR, U.H. BEHLING, R.C. BUTLER, A.G. JOHNSON, A.M. NOWOTNY, 1982: Molecular aspects of adjuvant and other beneficial effects of endotoxin.
In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 103
- OETTGEN, H.F., C.M. PINSKEY, L. DELMONTE, 1976: Treatment of cancer with immunomodulators. *Corynebacterium parvum* and Levamisol.
Med. Clin. North Am. 60, 511
- OLDS, G.R., L. CHEDID, E. LEDERER, A.F. MAHMOUD, 1980: Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* by natural cord factor and synthetic homologues.
J. Infect. Dis. 141, 473
- ONO, T., S. KURATA, K. WAKABAYASHI, Y. SUGAWARA, M. SAITO, H. OGAWA, 1973: Inhibitory effect of a streptococcal preparation (OK-432) on the nucleic acid synthesis in tumor cells in vitro.
Gann 64, 59
- OKUMURA, A., T. NITTA, M. NAKANO, 1981: In vitro proliferative response and polyclonal antibody production in spleen cells of immunologically defective CBA/N and C3H/HeJ mice by water soluble adjuvant (Bu-WSA) extracted from *Bacterionema matruchotii*.
Microbiol. Immunol. 25, 1139
- PARANT, M., F. AUDIBERT, F. PARANT, L. CHEDID, E. SOLER, V. POLONSKY, E. LEDERER, 1978: Non specific immunostimulant activities of synthetic trehalose-6,6-diester (lower homologs of cord factor).
Infect. Immun. 20, 12

- PARANT, M., 1980: Biological properties of a new synthetic adjuvant, muramyl dipeptide (MDP).
In: Immunostimulation, eds.: L. Chedid, P.A. Miescher, J.J. Mueller-Eberhard, Springer Verlag, Berlin, 1980, 111
- PETZOLDT, K., 1982: Stimulierung der nichterregerspezifischen Abwehr durch mikrobielle Immunmodulatoren.
Prakt. Tierarzt 63, 356
- PREVOT, A.R., 1975: Bacteriological aspects of anaerobic Corynebacteria in relation to RES stimulation.
In: Corynebacterium parvum, ed.: B. Halpern, Plenum Press, New York, 1975, 3
- PUIGDOLLERS, J.M., G.R. SERNA, I.H. DEL REY, M.T.T. BARRUFFET, J.J. TORROELLA, 1980: Immunglobulin production in man stimulated by an orally administered bacterial lysate.
Respiration 40, 142
- PULVERER, G., 1982: Immunmodulation mit Hilfe von Propionibakterien.
Dtsch. Med. Wochenschr. 107, 1491
- RAETTIG, H., 1976: Aktivitätssteigerung von Alveolarmakrophagen bei der Maus nach Inhalationsimpfung mit IRS-19.
Krankenhausarzt 49, 230
- RAETTIG, H., 1979: Ein Enteritis-Oralimpfstoff aus 12 hitzeinaktivierten Enterobakteriazenn. I. Mitt.: theoretische und epidemiologische Grundlagen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 245, 287
- RAETTIG, H., 1982: Paramunität nach oraler Antigenapplikation.
Fortschr. Med. 100, 792
- RÄSÄNEN, L., E. KARHUMÄKI, R. MAJURI, H. ARVILOMMI, 1980: Polyclonal activation of human lymphocytes by bacteria.
Infect. Immun. 28, 368

- RINALDO, C.R., B.C. COLE, J.C. OVERALL, L.A. GLASGOW,
1974: Induction of interferon in mice by Mycoplasmas.
Infect. Immun. 10, 1296
- ROSZKOWSKI, W., S. SZMIGIELSKI, H.L. KO, M. JANIAK, J.K.
WREMBEL, G. PULVERER, J. JELJASZEWICZ, 1980 a: Effect
of three strains of Propionibacteria (*P. granulosum*,
P. avidum, *P. acnes*) and cell-wall preparations on
lymphocytes and macrophages.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 246, 393
- ROSZKOWSKI, W., H.L. KO, K. ROSZKOWSKI, S. SZMIGIELSKI, J.
JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1980 b: The correlation
of susceptibility of different Propionibacterium
strains to macrophage killing and antitumor activity.
Med. Microbiol. Immunol. 169, 1
- ROSZKOWSKI, W., M. KOBUS, M. LUCZAK, H.L. KO, S. SZMI-
GIELSKI, B. LASKOWSKA, G. PULVERER, J. JELJASZEWICZ,
1980 c: Action of three species of Propionibacteria
(*P. granulosum*, *P. acnes*, *P. avidum*) on experimental
tumor system in mice.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 246, 405
- ROSZKOWSKI, K., W. ROSZKOWSKI, H.L. KO, S. SZMIGIELSKI,
G. PULVERER, J. JELJASZEWICZ, 1982: Clinical expe-
rience in treatment of cancer by Propionibacteria.
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G.
Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London,
1982, 331
- RUSCH, V., R.M. HYDE, T.D. LUCKEY, 1982: Immunomodulation
in Tiermodellen mit Präparaten intestinaler Bakterien.
Cytobiol. Rev. 6, 82
- ROYAMA, K., S. NATSUUME-SAKAI, H. HIROTA, S. KOSHIMURA,
1981: Reduced antitumor and immune-adjutant activi-
ties of the subcellular fractions from group A
Streptococcus.
Jpn. J. Exp. Med. 51, 335

- SAIKI, I., K.-I. KAMISANGO, Y. TANIO, H. OKUMURA, Y. YAMAMURA, I. AZUMA, 1982: Adjuvant activity of purified peptidoglycans of *Listeria monocytogenes* in mice and guinea pigs.
Infect. Imm. 38, 58
- SAITO, H., T. WATANABE, H. TOMIOKO, Y. HORIKAWA, O. TADO, 1980: Increased resistance to *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* induced by pretreatment with *Lactobacillus casei*.
Med. Biol. (Tokyo) 100, 285
- SATO, K., 1984: Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: role of macrophages.
Infect. Immun. 44, 445
- SCHINDLER, J., G. STEISSELE, H. KIRCHNER, 1981: Protection of mice against Mouse Hepatitis virus by *Corynebacterium parvum*.
Infect. Immun. 32, 1128
- SCHORLEMMER, H.U., J.H. EDWARDS, P. DAVIES, A.L. ALLISON, 1977: Macrophage responses to mouldy hay dust, *Micropolyspora faeni* and Zymosan, activators of complement by the alternative pathway.
Clin. Exp. Immunol. 27, 198
- SCHREIBER, K., 1982: Versuche mit dem Paramunitätsinducer BSK bei der Sau während der Geburt und im Puerperium.
Prakt. Tierarzt 63, 1066
- SCHRÖDER, J., 1981: Experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit und Wirkungsweise eines biologischen Immunmodulators.
Vet. Med. Diss. ., Hannover, 1981
- SCHULTZ, R.M., N.A. PAVLIDIS, M.A. CHIRIGOS, 1978 a: Macrophage involvement in the antitumor activity of *Brucella abortus* ether-extract against experimental lung carcinoma metastases.
Cancer Res. 38, 3427

- SCHULTZ, R.M., M.A. CHIRIGOS, N.A. PAVLIDIS, J.S. YOUNGNER,
1978 b: Macrophage activation and antitumor activity
of a Brucella abortus ether-extract, Bru-Pel.
Cancer Treat. Rep. 62, 1937
- SCOTT, M.T., 1972: Biological effects of the adjuvant Corynebacterium parvum. I. Inhibition of PHA, mixed lymphocyte and GVH reactivity.
Cell. Immunol. 5, 459
- SCOTT, M.T., 1974: Depression of delayed hypersensitivity by Corynebacterium parvum: mandatory role of the spleen.
Cell Immunol. 13, 251
- SCOTT, M.T., 1975: Potentiation of the tumor-specific immune response by Corynebacterium parvum.
J. Nat. Cancer Inst. 55, 65
- SEDLACEK, H.H., 1984: How to find immunomodulators - a look backward and forward.
Behring Inst. Mitt. 74, 122
- SETERFITT, V.C., J.W. SHANDS, 1970: Salmonellosis in mice infected with Mycobacterium bovis BCG. II. Resistance to infection.
Infect. Immun. 1, 583
- SKIDMORE, B.J., J.M. CHILLER, D.C. MORRISON, W.O. WEIGLE, 1975: Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharides (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant and immunogenic activities.
J. Immunol. 114, 770
- SMETS, P., 1984: Persönliche Mitteilung.
Centre de Recherche Immunologique des Laboratoires Cassenne, Osny, France
- SMITH, S.M., R. BURRELL, I.S. SNYDER, 1978: Complement activation by cell wall fraction of Micropolyspora faeni.
Infect. Immun. 22, 568

- SMITH, S.M., I.S. SNYDER, R. BURRELL, 1980: Mitogenic response to Micropolyspora faeni cell walls.
J. Allergy Clin. Immunol. 65, 298
- SMITH, E.M., H.M. JOHNSON, J.E. BLALOCK, 1983: Staphylococcus aureus protein A induces the production on interferon- α in human lymphocytes and interferon- α/β in mouse spleen cells.
J. Immunol. 130, 773
- SPENCER, J.C., R. GANGULY, R.H. WALDMAN, 1977: Nonspecific protection of mice against Influenza virus infection by local or systemic immunization with Bacille Calmette-Guerin (BCG).
J. Infect. Dis. 136, 171
- STARR, S.E., A.M. VISINTINE, M.O. TOMEH, A.J. NAHMIAS, 1976: Effects of immunostimulants on resistance of newborn mice to Herpes simplex type 2 infection (39327).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152, 57
- STEWART-TULL, D.E.S., 1983: Immunopotentiating products of bacteria.
In: Medical Microbiology Volume 2, Immunization against bacterial disease, eds.: C.S.F. Easmon, J. Jeljaszewicz, Academic Press, London, 1983, 1
- STINEBRING, W.R., J.S. YOUNGNER, 1964: Patterns of interferon in mice injected with bacteria and bacterial endotoxins.
Nature 204, 712
- STYLOS, W.A., M.A. CHIRIGOS, C.R. LENGEL, 1978: Lymphocyte stimulatory effect of an ether-extracted preparation of Brucella abortus.
Cancer Treat. Rep. 62, 1949

- SWARTZBERG, J.E., J.L. KRAHENBUHL, J.R. REMINGTON, 1975:
Dichotomy between macrophage activation and degree
of protection against *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* in mice stimulated with *Corynebacterium parvum*.
Infect. Immun. 12, 1037
- SZMIGIELSKI, S., M. KOBUS, J. GIL, J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1980: Protection and therapy of mice with
acute and chronic experimental virus infection with
Propionibacterium granulosum KP-45.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 248, 286
- SZMIGIELSKI, S., W. ROSZKOWSKI, K. ROSZKOWSKI, H.L. KO,
J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1982: Experimental
immunostimulation by *Propionibacteria*.
In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewicz, G.
Pulverer, W. Roszkowski, Academic Press, London,
1982, 129
- TAKADA, H., M. TSUJIMOTO, T. OGAWA, Y. ISHIHARA, A. KAWA-
SAKI, S. KOTANI, A. TANAKA, S. NAGAO, K. KUSHIMA, T.
FUJIKI, A. KATO, 1982: Immunomodulating activity of
Biostim.
*In: Immunomodulation by microbial products and rela-
ted synthetic compounds*, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani,
Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 266
- TURCOTTE, R., 1981: Evidence for 2 distinct populations of
suppressor cells in the spleen of *Mycobacterium bovis*
BCG-sensitized mice.
Infect. Immun. 34, 315
- UCHIDA, A., M. MICKSCHE, T. HOSHINO, 1982: Effect of OK-432
on the natural killer cell activity of mononuclear
cells in circulating blood and carcinomatous pleural
effusion.
*In: Immunomodulation by microbial products and rela-
ted synthetic compounds*, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani,
Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 446

- UCHIYAMA, T., D.M. JACOBS, 1978: Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS): multifocal effects of LPS-induced suppression of the primary antibody response to a T-dependent antigen. *J. Immunol.* 121, 2340
- VOGEL, S.N., G.S. MADONNA, L.M. WAHL, P.D. RICK, 1984: Stimulation of spleen cells and macrophages of C3H/HeJ mice by a lipid A precursor derived from *Salmonella typhimurium*. *Rev. Infect. Dis.* 6, 535
- VOICULESCU, C.L., C. NEDELICU, F. MICSICH, O. CHITA, S. ROGOZ, L. STANCIU, 1982: Experimental study of liposome-enclosed enterobacterial LPS as immunoadjuvant in cell-mediated immunity against Cocksackie A₉ virus. In: *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 285
- WEISS, D.W., 1976: MER and other mycobacterial fractions in the immunotherapy of cancer. *Med. Clin. North Am.* 60, 473
- WIENER, E., A. BANDIARDI, 1975: Modification in the handling in vitro of ¹²⁵I-labelled keyhole limpet haemocyanin by peritoneal macrophages from mice pretreated with the adjuvant *Corynebacterium parvum*. *Immunology* 29, 265
- YAMAMURA, Y., I. AZUMA, 1982: Cancer immunotherapy with cell-wall skeletons of BCG and *Nocardia rubra* and related synthetic compounds. In: *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 17

- YARKONI, E., A. BEKIERKUNST, 1976: Nonspecific resistance against infection with *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* induced in mice by cord factor (trehalose-6,6-dimycolate) and its analogues.
Infect. Immun. 14, 1125
- YARKONI, E., L. WANG, A. BEKIERKUNST, 1977: Stimulation of macrophages by cord factor and by heatkilled and living BCG.
Infect. Immun. 16, 1
- YOUNGNER, J.S., G. KELETI, D.S. FEINGOLD, 1974: Antiviral activity of an ether-extracted nonviable preparation of *Brucella abortus*.
Infect. Immun. 10, 1202
- ZABALA, C., P.E. LIPSKY, 1982: Immunomodulation by bacterial endotoxin and other bacterial products in man. In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds, eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 117
- ZINNER, S.H., G. PETER, 1983: The potential role of cell wall core glycolipids in the immunoprophylaxis and immunotherapy of gram-negative rod bacteraemia. In: Medical Microbiology Volume 2, Immunization against bacterial disease, eds.: D.S.F. Easmon, J. Jeljaszewicz, Academic Press, London, 1983, 71

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. G. Baljer bedanke ich mich für die jederzeit gewährte wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern in seinem Labor für das angenehme Arbeitsklima und für ihre stets freundliche Hilfe.

LEBENS LAUF

Geboren: am 25. Juli 1957 in Erlangen

Eltern: Otto Adler
Herta Adler, geb. Öhl

Schulbesuch: 1963 - 1967 Michael-Poeschke- Volksschule in Erlangen
1967 - 1976 Christian-Ernst-Gymnasium in Erlangen

Abitur: 25. Juni 1976

Studium: 1977 - 1979 an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Tiermedizin
1979 - 1983 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Fachbereich Tiermedizin

Staatsexamen: 24. Mai 1983

Bestallung: 20. Juli 1983

Tierärztliche Tätigkeit: seit September 1983 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München als Doktorand

